REINIGUNG UND UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTURAUFKLÄRUNG VON DREI ANTIBIOTIKA

Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften
dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Ursula Dähn
aus Neuhausen a.d.F.

1975

75 355

REINIGUNG UND UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTURAUFKLÄRUNG VON DREI ANTIBIOTIKA

Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften
dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Ursula Dähn
aus Neuhausen a.d.F.

1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 5. 1975

Dekan: Prof. Dr. H. Auterhoff

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-P. Hagenmaier

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Auterhoff

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. H.-P. Hagenmaier,

danke ich sehr herzlich für die Anregungen und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. W. A. König danke ich herzlich für die Aufnahme der Massenspektren und die Hilfe bei ihrer Interpretation.

Herrn Professor Dr. W. Keller-Schierlein bin ich zu Dank verpflichtet für die Hilfe bei der Interpretation des NMR-Spektrums.

Herrn Bartholomä danke ich vielmals für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Unterstützung der Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 76.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542728_0049

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Nikkomycin	4
2.1	Biologische Wirksamkeit	4
2.2	Reinigung des Antibiotikums Nikkomycin	5
2.21	Testmethoden	5
2.211	Der biologische Test	5
2.212	Chemische Nachweise	6
2.22	Untersuchungen zur Reinisolierung von Nikkomycin	7
2.221	Trennung an Kationenaustauschern	7
2.2211	Chromatographie am Kationenaustauscher Beckman M-72	7
2.2212	Chromatographie am Kationenaustauscher Aminex AG 50 WX - 4	9
2.222	Trennung durch Gelfiltration an Biogel	9
2.223	Trennung durch Verteilungschromatographie an Cellulose	10
2.23	Aufarbeitungsverfahren zur präparativen Reinigung von Nikkomycin	11
2.3	Charakterisierung des Antibiotikums	15
2.4	Untersuchungen zur Strukturaufklärung von Nikkomycin	20
2.41	Hydrolysen	20
2.411	Totalhydrolyse mit Säure im analytischen Maßstab	20

2.412	Totalhydrolyse mit Säure im präparativen Maßstab	21
2.413	Partialhydrolyse mit 12 N HCl	22
2.414	Partialhydrolyse mit 1 N Trifluoressigsäure	23
2.42	Präparative Dünnschichtchromatographie	25
2.5	Identifizierung der isolierten Fragmente	26
2.51	Ermittlung der Struktur der Substanz VII/VIII	26
2.52	Ermittlung der Struktur der Substanz I	37
2.6	Vergleich von Nikkomycin mit den Polyoxinen	45
2.7	3-Cyclohexenylglycin	49
2.8	Zur Synthese von C-Hydroxypyridylhomothreonin	51
2.81	Synthese von 4-Dihydrokynurenin und 4-Dihydrohydroxykynurenin	52
2.82	N-Hydroxyphenyl-N-α-aminobuttersäurehydroxylamin	53
2.83	Synthese von α-Amino-β-methyl-γ-hydroxy-γ-(5-Hydroxy)pyridyl-(2)-buttersäure	58
3.	Antibiotikum AB-31	62
3.1	Reinigung des Antibiotikums AB-31	62
3.2	Charakterisierung des Antibiotikums AB-31	63

4.	Antibiotikum aus Tü 1148	69
4.1	Reinigung	69
4.11	Testmethoden	69
4.12	Trennung an Kieselgel	69
4.2	Charakterisierung	70
5.	Zusammenfassung	73
6.	Experimenteller Teil	76
6.1	Reinigung von Nikkomycin	76
6.11	Plattendiffusionstest	76
6.12	Chemische Nachweise	76
6.13	Dünnschichtchromatographie	76
6.14	Präparative Dünnschichtchromatographie	77
6.15	Analytische Trennung an Kationenaustauscherharzen	77
6.16	Präparative Trennung an Dowex 50 WX-8	78
6.17	Gelchromatographie	79
6.18	Verteilungschromatographie an Cellulose	79
6.2	Reinigung des Antibiotikums AB-31 und des Antibiotikums aus Tü 1148	80
6.21	Antibiotikum AB-31	80
6.22	Antibiotikum aus Tü 1148	80
6.3	Hydrolysen	80
6.31	Totalhydrolyse	81
6.32	Partialhydrolyse	81
6.33	Hydrolyse in Trifluoressigsäure	81
6.34	Alkalische Hydrolyse	81
6.4	Präparative Trennung der Säurehydrolysate	82

6.41	Chromatographie des Totalhydrolysats an Kationenaustauscherharz	82
6.42	Chromatographie des Partialhydrolysats an Biogel P-6	83
6.5	Derivate für die Massenspektrometrie	83
6.51	Trimethylsilyl Derivat	83
6.52	Perdeuterio-trimethylsilyl-Derivat	84
6.53	Veresterung und Trimethylsilylierung	84
6.54	Trifluoracetylierung und Methylierung mit Diazomethan	84
6.55	Trifluoracetylierung und Methylierung mit HCl/Methanol	84
6.6	Synthese von 4-Dihydrokynurenin und 4-Dihydrohydroxykynurenin	85
6.61	Reduktion von Kynurenin	85
6.62	Reduktion von Hydroxykynurenin	85
6.7	Synthese von N-Hydroxyphenyl-N-α-aminobuttersäure-hydroxylamin	85
6.8	Synthese von α-Amino-ß-methyl-γ-hydroxy-γ-(5-Hydroxy)-pyridyl-(2)-buttersäure	90
6.9	Geräte und Chemikalien	92
7.	Literaturverzeichnis	93

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

BOC-	=	t-Butyloxycarbonyl-
Bzl-	=	Benzyl-
DC	=	Dünnschichtchromatographie
Hpht	=	C-Hydroxypyridyl-homothreonin
TFA	=	Trifluoressigsäure
THF	=	Tetrahydrofuran
TMS	=	Trimethylsilyl-
Tü	=	Stammbezeichnung für Mikroorganismen des Institutes für Biologie der Universität Tübingen, Lehrbereich Mikrobiologie

Die Abkürzungen der Aminosäuren entsprechen den IUPAC-Regeln.

1. EINLEITUNG

Die Erscheinung, daß in Mischkulturen von Mikroorganismen Keime geschwächt werden oder gar nicht wachsen, wurde schon von Pasteur 1877[1] beobachtet und zwei Jahre später von De Bary[2] als Antibiose bezeichnet. Solche Antibiosen wurden in den darauffolgenden Jahren von zahlreichen Wissenschaftlern beschrieben (C. Garre 1887[3], E. Freudenreich 1889[4], M. Ward 1899[5]). R. Emmerich und O. Löw[6] isolierten bereits 1899 eine Substanz, die das Wachstum von Typhus- und Cholerabazillen hemmt und die, da man sie für ein Ferment hielt, Pyocyanase genannt wurde. Die eigentliche Antibiotikaforschung begann aber erst 1928 nach der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming[7]. Er beobachtete, daß eine Staphylokokkenkultur, die durch eine Schimmelpilzkolonie (Penicillium notatum) verunreinigt war, in der Umgebung der Pilze eine Hemmung des Staphylokokkenwachstums zeigte. Nach dem Penicillin wurden 1939 von R. J. Dubos[8] Tyrothricin und Gramicidin und 1940 von S. A. Waksman und H. B. Woodruff[9] das Actinomycin isoliert. Bis heute kennt man über 1200 Antibiotika, jedoch finden nur ungefähr 80 in der Human- und Tiermedizin Verwendung[10].

Der Begriff Antibiotikum wurde 1942 von S. A. Waksman geprägt[11]. Er verstand darunter Substanzen, die von Mikroorganismen gebildet werden und auf andere Mikroorganismen eine hemmende oder zerstörende Wirkung ausüben.

Inzwischen wurde diese Definition jedoch oftmals abgeändert und von R. Brunner folgendermaßen formuliert: "Ein Antibiotikum ist eine im Stoffwechsel von lebenden Zellen erzeugte und erstmalig aus ihnen isolierte, chemisch definierte und reproduzierbare Substanz oder eines ihrer auf chemosynthetischem oder biosynthetischem Wege erzeugten Derivate, die ihre entwicklungshemmende oder abtötende Wirkung gegen pflanzliche oder tierische Mikroorganismen in geringer Konzentration ausübt."[12] Diese Hemmung biosynthetischer Reaktionen wird bewirkt durch die Inaktivierung eines Substrats, Enzyms oder Faktors, an den das Antibiotikum spezifisch gebunden wird. Das Antibiotikum selbst besitzt keinen Enzymcharakter.

Der chemische Bau der Antibiotika zeichnet sich oft dadurch aus, daß er sonst ungewöhnliche Bindungsarten oder Aminosäuren, die in Peptiden und Proteinen nicht gefunden werden, enthält.

Viele Mikroorganismen sind inzwischen gegen mehrere Antibiotika resistent geworden, was bedingt ist durch eine Unempfindlichkeit der Bakterien oder durch Inaktivierung des Antibiotikums durch ein bakterielles Enzym. Daher ist es notwendig, die Forschung nach neuen, klinisch verwendbaren antimikrobiellen Stoffen auch heute noch fortzusetzen. Neuerdings finden Antibiotika auch in der Landwirtschaft Anwendung, z.B. als Pflanzenschutzmittel oder Futtermittelzusätze und in der Lebensmittelindustrie zur Konservierung.

In dieser Arbeit werden drei Antibiotika beschrieben. Nach der Isolierung und Reinigung der Antibiotika, die von den Bakterienstämmen Tü 901, Tü 1158 und B 31 produziert wurden, sollten Versuche zur Strukturermittlung durchgeführt werden. Bei Nikkomycin (Tü 901), dem am ausführlichsten behandelten Antibiotikum, wurde auch versucht, das Molekül teilweise zu synthetisieren.

2. NIKKOMYCIN

2.1 Biologische Wirksamkeit

Das von H. Höhne in seiner Dissertation "Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der mikrobiellen Chitinsynthese"[13] beschriebene und auf seine biologische Wirksamkeit hin untersuchte Antibiotikum wird von einem Actinomycetales-Stamm (Tü 901) gebildet, der erstmals in einer Bodenprobe gefunden wurde, die aus Nikko (Japan) stammte. Der Mikroorganismus gehört zur Art Streptomyces tendae Ettlinger. Nach dem Fundort des Produzenten wurde das Antibiotikum mit dem Namen Nikkomycin benannt.

Bei der Untersuchung der biologischen Wirksamkeit von Nikkomycin wurde festgestellt[13], daß alle getesteten Bakterien gegen das Antibiotikum unempfindlich waren und nur das Wachstum von Pilzen gehemmt wurde. Bei Mucor hiemalis (+/-) und Botrytis cinerea konnte man dabei an den Hyphenspitzen keulenartige Veränderungen feststellen. Diese "Keulenbildung" deutet in vielen Fällen auf eine Störung der Zellwandsynthese hin[14,15]. Durch den Einbau von radioaktiv markiertem N-Acetyl-D-glucosamin, Uracil und Isoleucin in Zellen von Mucor hiemalis (+) konnte H. Höhne zeigen, daß durch Nikkomycin vor allem die Chitinsynthese gehemmt wird, und zwar zu 80 %. Die RNS-Synthese wird zu 60 %, die Proteinsynthese zu 40 % gehemmt. In vitro durchgeführte Versuche ergaben, daß Nikkomycin eine particuläre Chitinsynthetase aus Mucor hiemalis (+) kompetitiv hemmt.

2.2 Reinigung des Antibiotikums Nikkomycin

2.21 Testmethoden

Um bei den einzelnen Reinigungsschritten die Verteilung des Antibiotikums Nikkomycin verfolgen zu können, wurden zwei Nachweismethoden angewandt: der Plattendiffusionstest zur Prüfung auf biologische Aktivität und das chemische Nachweisverfahren.

2.211 Der biologische Test

Unter Aktivität versteht man das Vermögen einer Substanz, das Wachstum eines Keimes zu hemmen bzw. ihn abzutöten. Der mikrobiologische Test ist also ein direktes Maß für die Aktivität eines Stoffes.

Beim Plattendiffusionstest werden Filterpapierscheibchen, die mit einer Lösung der zu untersuchenden Substanz getränkt wurden, auf ein Agar-Nährmedium gelegt, dem eine Sporensuspension der Testorganismen Mucor hiemalis (+) und Mucor hiemalis (-) hinzugegeben wurde. Bei konstanten Versuchsbedingungen (gleiche Schichtdicke des Nährbodens, gleiche Einsaatdichte, gleiche Volumina der zu testenden Lösungen, gleiche Bebrütungszeiten usw.) ist der Hemmhofdurchmesser der Zygosporen proportional dem Logarithmus der Konzentration des Antibiotikums[16]. Da aber gerade die Konstanthaltung aller Versuchsbedingungen sehr schwierig war (z.B. unterschiedliches Alter der Sporensuspension), wurde der Aktivitätstest meistens nur halbquantitativ durchgeführt.

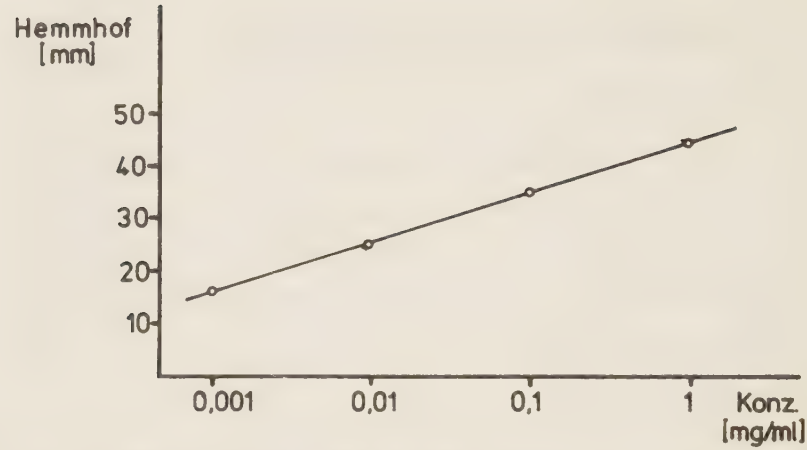


Abb. 1: Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers der Zygosporen vom Logarithmus der Nikkomycin-Konzentration

2.212 Chemische Nachweise

Beim chemischen Nachweis wird die mehr oder weniger spezifische Reaktion funktioneller Gruppen der zu testenden Substanzen ausgenutzt. So hatte sich bei der Dünnschichtchromatographie des Rohantibiotikums in verschiedenen Laufmitteln gezeigt, daß die im Bioautogramm nachgewiesene Aktivität stets mit einem Ninhydrin-positiven Fleck zusammenfiel. Dies ließ darauf schließen, daß die Ninhydrin-positive Reaktion für das Nikkomycin charakteristisch ist. Neben dem Aktivitätstest wurde daher bei den Reinigungsversuchen immer die Ninhydrinreaktion zur Identifizierung des Antibiotikums herangezogen. Eine positive Reaktion aber geben Aminosäuren, Amine, Säureamide und ähnliche Gruppierungen[17].

Außerdem zeigt das Antibiotikum nach der Behandlung mit

Natriummetaperjodatlösung eine positive Reaktion mit Benzidin[18]. Dies läßt auf die Existenz einer Diol-Komponente schließen.

2.22 Untersuchungen zur Reinisolierung von Nikkomycin

Zur Bearbeitung wurden von H. Höhne Rohprodukte übernommen, deren Gehalt an Nikkomycin zwischen 1 % und 10 % betrug. Die Reinigungsschritte, die dieses Produkt durchlaufen hatte, waren Adsorption an Aktivkohle und Elution mit einer Mischung aus Aceton und Ameisensäure. Das Eluat wurde im Vakuum eingeengt, bis ein zähflüssiges Konzentrat übrigblieb. Bei der Isolierung des Antibiotikums Nikkomycin aus diesem Konzentrat erwiesen sich vor allem große Mengen an Begleitmaterial, das aus dem verwendeten Nährmedium (Sojamehl) stammte, als störend.

2.221 Trennung an Kationenaustauschern

2.2211 Chromatographie am Kationenaustauscher Beckman M-72

Bei Untersuchungen zur Trennung von Oligopeptiden fand H. Frank[19], daß das für die Aminosäureanalyse entwickelte Kationenaustauscherharz Beckman M-72 ein ausgezeichnetes Auflösungsvermögen für hydrophile Verbindungen bis zu einem Molekulargewicht von 800 besitzt. Die Verwendung flüchtiger Pyridinacetat-Puffer erlaubt dabei die direkte Übertragung eines analytischen Verfahrens auf den präparativen Maßstab.

In ersten Voruntersuchungen wurden Bedingungen gesucht,

unter denen Nikkomycin von der Beckman -M-72-Säule eluiert wird. Dies ist bei pH-Werten oberhalb 4,5 der Fall. Um einen optimalen Trenneffekt zu erreichen, wurde für Trennungen bis zu 100 mg zur Elution ein linearer pH- und Ionenstärke-Gradient verwendet.

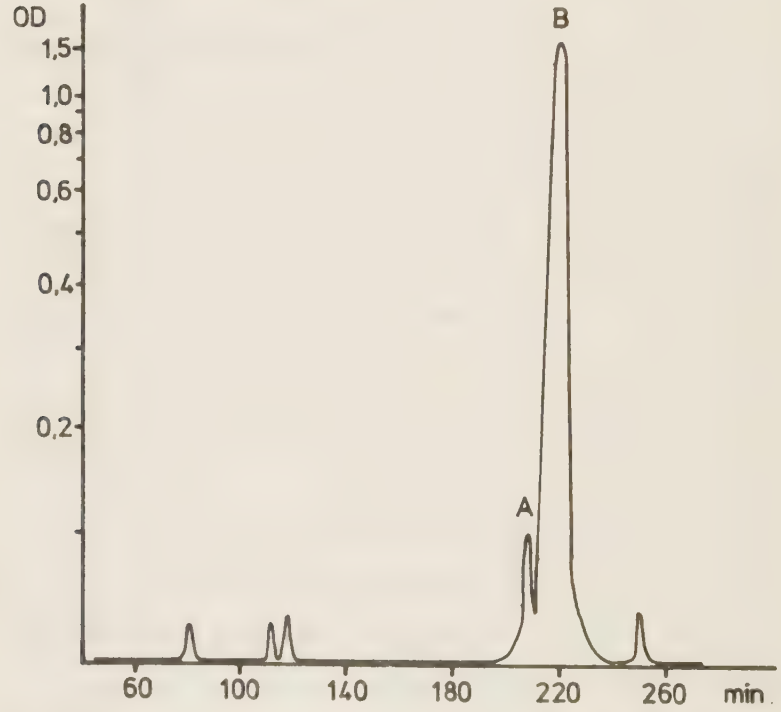


Abb. 2: Elutionsdiagramm von Nikkomycin am Kationenaustauscherharz Beckman M-72

Abbildung 2 zeigt die unter diesen Bedingungen aufgrund der Ninhydrinreaktion erhaltene Elutionskurve für das Rohantibiotikum. Die beiden Peaks A und B konnten auch präparativ getrennt werden. Beide zeigten gleiche biologische Aktivi-

tät, gleiche Rf-Werte im Dünnschichtchromatogramm. Vermutlich handelt es sich um Diastereomere (siehe auch unter Ziff. 2.51). Die Rechromatographie des über Beckman M-72 gereinigten Nikkomycins an demselben Austauscherharz war jeweils mit einem Substanzverlust von etwa 40 % verbunden.

2.2212 Chromatographie am Kationenaustauscher Aminex AG 50 WX - 4

Zur Reinigung von Rohantibiotikum bis zu 1 g wurde eine Aminex AG 50 WX-4-Säule unter Anwendung der für das Beckman -M-72-Harz ausgearbeiteten Bedingungen benutzt. Weitgehend reines Nikkomycin konnte auch hier erhalten werden, allerdings mit schlechter Ausbeute.

2.222 Trennung durch Gelfiltration an Biogel

Da sich die Trennung des Rohantibiotikums am Ionenaustauscher unter Verwendung von Essigsäure als Elutionsmittel aufgrund der Labilität des Nikkomycins als ungünstig erwies, wurde nach Trennsystemen gesucht, bei denen niedere pH-Werte vermieden werden. Dafür bot sich die Gelfiltration an Biogel an. Zunächst wurde hierfür Biogel P-6 verwendet. Es zeigte sich jedoch, daß Nikkomycin unter Verwendung von Wasser als Elutionsmittel vollständig an Biogel unter Adsorption festgehalten wird. Dieser Effekt war etwas unerwartet, da Biogel, im Gegensatz zu Sephadex, keine Adsorptionseffekte aufweisen soll. Erst mit 1 %iger Essigsäure konnte das Antibiotikum von der Biogel-P-6-Säule eluiert werden. Hier-

durch konnte zwar ein hoher Reinigungseffekt erreicht werden, der jedoch durch partielle Zersetzung des Antibiotikums beim Gefriertrocknen aus der Essigsäurelösung teilweise wieder verlorenging.

An Biogel P-2 trat der beschriebene Adsorptionseffekt nicht auf und die Elution des Nikkomycins konnte mit Wasser allein durchgeführt werden. Bei der Chromatographie des Rohantibiotikums an Biogel P-2 zeigte sich, daß der größte Teil der aus der Nährlösung stammenden Begleitsubstanzen vor dem Antibiotikum eluiert wird und eine Anreicherung des Nikkomycins in den aktiven Fraktionen auf etwa 50 % erfolgte. Die Gelfiltration an Biogel P-2 stellt also ein schonendes und wirksames Verfahren auf dem Weg zur Reinisolierung des Nikkomycins dar.

2.223 Trennung durch Verteilungschromatographie an Cellulose

Von H. Kneifel[20] wurde festgestellt, daß sich die Verteilungschromatographie an Cellulose mit Propanol-Wasser-Gemischen mit sehr guten Erfolgen von der Dünnschichtchromatographie auf präparative Säulen übertragen läßt. Bei der Dünnschichtchromatographie des Rohproduktes in Propanol-Wasser-Gemischen von 7 : 3, 8 : 2 und 9 : 1 wurde festgestellt, daß sich im System Propanol : Wasser = 7 : 3 die beste Trennung erzielen läßt.

Zur Übertragung auf die präparative Säulenchromatographie wurde der Anteil an polarer Phase verringert[21] und zur Elution eine Mischung aus 8 Teilen Propanol und 2 Teilen

Wasser gewählt. Nach dem biologischen Test wurden die aktiven Fraktionen vereinigt, das Propanol im Vakuum abgezogen, der Rückstand mit Wasser versetzt und gefriergetrocknet. Das nach diesem Trennverfahren erhaltene Produkt erwies sich als weitgehend einheitlich.

Bei dieser Auftrennung des Rohantibiotikums an Cellulose wurde eine weitere Ninhydrin-positive Substanz isoliert, deren Charakterisierung unter Cyclohexenylglycin beschrieben wird.

2.23 Aufarbeitungsverfahren zur präparativen Reinigung von Nikkomycin

Aufgrund der bei den beschriebenen Reinigungsversuchen gemachten Erfahrungen wurde zur Reinigung des Antibiotikums, aus Züchtungsansätzen im 200-l-Fermenter, nach dem in Abbildung 3 angegebenen Trennschema verfahren. Das Kulturfiltrat wurde zur Adsorption des Antibiotikums über Aktivkohle filtriert und das Antibiotikum anschließend mit einer Mischung aus Aceton / Ameisensäure eluiert. Das nach dem Einengen erhaltene zähflüssige Konzentrat (ca. 600 ml, Gehalt an Nikkomycin: 1 %) wurde in Pyridin-Essigsäure-Puffer (0,1 M, pH 2,8) aufgenommen und an Dowex 50 WX-8 Ionenaustauscherharz adsorbiert. Die Elution erfolgte mit Pyridin-Essigsäure-Puffer bei pH 5,6 (2 M). So konnten große Mengen an Begleitmaterial entfernt werden. Die hier auftretende teilweise Zersetzung des Antibiotikums wurde aufgrund des erzielten hohen Reinigungseffektes in Kauf genommen.

Kulturfiltrat

Adsorption des Antibiotikums an Kohle
Elution mit 80 % Aceton/20 % Ameisensäure 0,5 N

Eluat I

Einengen
Adsorption an Dowex 50 WX-8
Elution mit Pyridin-Essigsäure-Puffer (pH 5,6, 2 M)

Eluat II

Einengen
Pyridinacetat abfiltrieren
Gefriertrocknen

Rohantibiotikum I

Chromatographie an Biogel P-2

Eluat III

Einengen, gefriertrocknen

Rohantibiotikum II

Chromatographie an Biogel P-2

Eluat IV

Einengen, gefriertrocknen

Nikkomycin

Endreinigung durch Ionenaustausch- und Verteilungschromatographie

Reinsubstanz

Abb. 3: Trennschema zur präparativen Aufarbeitung von Nikkomycin

Das aktive Eluat (ca. 2 l) wurde im Vakuum eingeengt und dabei ausfallendes, kristallines Pyridinacetat abfiltriert. Das Filtrat (300 ml) wurde mit der doppelten Menge Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Die erhaltene Substanz (120 g) war dunkelbraun, klebrig und sehr hygroskopisch. Sie wurde in Portionen zu 10 g in Wasser gelöst und zur weiteren Reinigung auf einer Biogel P-2 Säule mit Wasser chromatographiert.

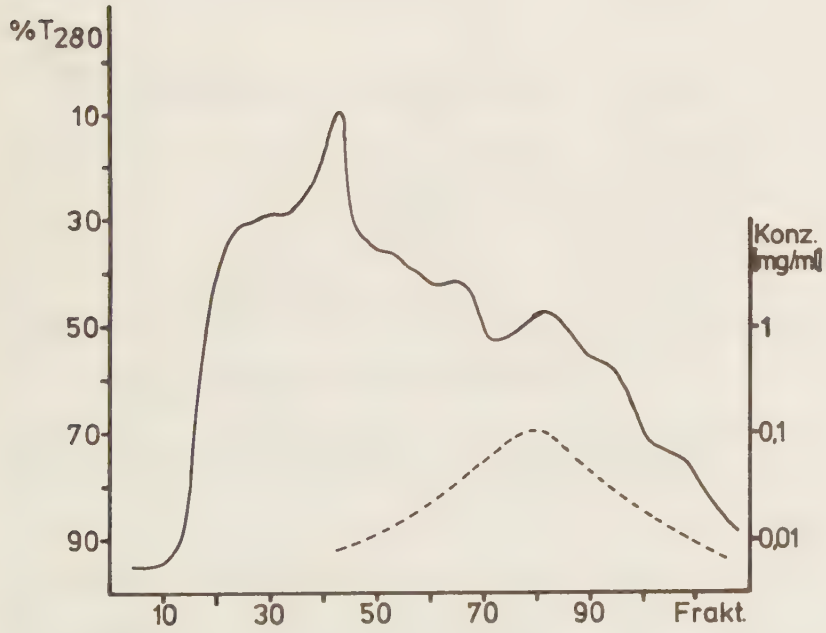


Abb. 4: Elutionsdiagramm (Aktivitätsdiagramm) des Antibiotikums Nikkomycin. Chromatographie an Biogel P-2

Elutionsdiagramm (——)
Aktivitätsdiagramm (---)

Die im Plattendiffusionstest aktiven Fraktionen wurden jeweils vereint und gefriergetrocknet. Da das so erhaltene Produkt immer noch braun gefärbt war, wurde es nochmals an Biogel P-2 chromatographiert (siehe Abbildung 5).

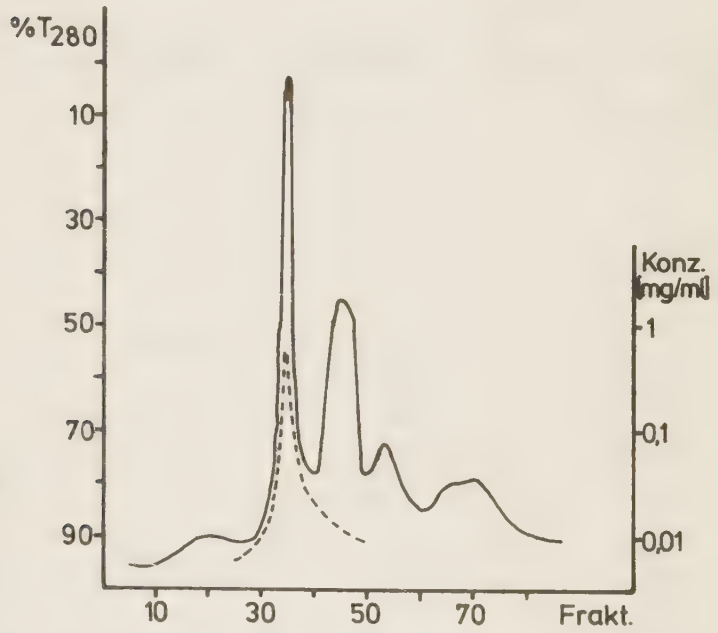


Abb. 5: Elutionsdiagramm (——) und Aktivitätsdiagramm (---) Chromatographie an Biogel P-2

Nach diesem Aufarbeitungsschritt war die aktive Substanz noch schwach gelb. Eine nochmalige Trennung an Biogel P-2 brachte keine weitere Anreicherung. Die Ausbeute von einem 200-l-Fermenter betrug 1 g bis 1,5 g.

Für die meisten Untersuchungen zur Strukturaufklärung war

das auf diese Weise erhaltene Produkt genügend rein und wurde so eingesetzt. Wenn völlig einheitliches Nikkomycin benötigt wurde, wie bei der Bestimmung der Elementarzusammensetzung oder für die Aufnahme der IR- und UV-Spektren, wurde das auf die beschriebene Weise erhaltene Produkt zunächst über den Kationenaustauscher Beckman M-72 und anschließend durch Verteilungschromatographie über Cellulose weiter gereinigt.

Insgesamt wurden jeweils etwa 2 bis 3 Monate zur Aufarbeitung eines 200-l-Fermenters benötigt.

2.3 Charakterisierung des Antibiotikums

Reines Nikkomycin ist farblos und fällt bei der Gefriertrocknung in voluminösen Flocken an. Versuche zur Kristallisation waren bisher nicht erfolgreich. In Wasser und Pyridin ist Nikkomycin sehr gut löslich, aber praktisch unlöslich in organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Äthanol, Benzol, Chloroform, Essigester und Äther.

Die Substanz zeigt eine positive Reaktion mit Ninhydrin, Natriummetaperjodat - Benzidin und Kaliumpermanganat. Mit Eisen-(III)-chlorid erhält man eine Gelbfärbung, die jedoch nicht sehr intensiv ist.

Bei der Dünnschichtchromatographie traten in allen verwendeten Lösungsmittelsystemen, die Essigsäure enthielten, mehrere Flecken auf. Diese Tatsache kann darauf zurückgeführt werden, daß das Antibiotikum so säurelabil ist, daß schon

durch die im Fließmittel enthaltene Essigsäure eine partielle Hydrolyse der Substanz bewirkt wird. In den Fließmitteln Propanol / Wasser oder Butanol / Pyridin / Wasser zeigte sich jedoch jeweils nur ein Ninhydrin-positiver Fleck.

Folgende Fließmittelsysteme wurden bei der Dünnschichtchromatographie verwendet:

Nr.	Fließmittel	Schichtmaterial	Rf_1	Rf_2	Rf_3
1	Äthanol/Eisessig/ Wasser (4:1:1)	Cellulose	0,1	0,3	0,5
2	Propanol/Wasser (8:2)	Cellulose		0,36	
3	Butanol/Eisessig/ Wasser (3:1:1)	Kieselgel	0,05	0,1	0,15
4	Butanol/Eisessig/ Pyridin/Wasser (42:4:24:30)	Kieselgel	0,35	0,45	0,55
5	Butanol/Pyridin/ Wasser (1:1:1)	Kieselgel		0,4	
6	Propanol/Pyridin/ Eisessig/Wasser (15:10:3:12)	Kieselgel	0,6	0,7	0,75

Tab. 1: Rf-Werte von Nikkomycin in den verwendeten Fließmittelsystemen

Die Elementaranalyse des Antibiotikums Nikkomycin ergab folgende Werte:

C	H	N	O
48,21	5,08	13,58	31,58

Aus dieser Analyse läßt sich die Summenformel errechnen:

$$(C_4 H_5 N_1 O_2)_x$$

Nach der kryoskopischen Methode wurde für Nikkomycin ein Molekulargewicht von 403 - 406 bestimmt. Danach würde die Summenformel für Nikkomycin lauten:

$$(C_4H_5N_1O_2)_4 \equiv C_{16}H_{20}N_4O_8 \equiv \text{MG } 396$$

An späterer Stelle wird jedoch gezeigt, daß das tatsächliche Molekulargewicht 495 ist und der Substanz demnach die Summenformel

$$(C_4H_5N_1O_2)_5 \equiv C_{20}H_{25}N_5O_{10} \equiv \text{MG } 495$$

zukommt.

Berechnete Werte für die elementare Zusammensetzung $C_{20}H_{25}N_5O_{10}$:

C	H	N	O
48,48	5,05	14,14	32,32

Das Ultraviolett-Absorptions-Spektrum von Nikkomycin zeigt, gemessen in 0,05 N HCl, ein Maximum bei 285 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 150) und eine Schulter bei 230 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 123). In 0,05 N NaOH verschiebt sich das Maximum nach 300 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 105) und zusätzlich tritt bei 240 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 250) ein Absorptionsmaximum auf (Abbildung 6).

Das Infrarot-Spektrum von Nikkomycin (Abbildung 7) zeigt keine charakteristischen Signale; die breite Bande bei 3100 cm^{-1} läßt auf Wasserstoffbrücken schließen. Die ausgeprägte Bande bei 1660 cm^{-1} kann sowohl einem sekundären Amid als auch einer Aminosäure zugeordnet werden.

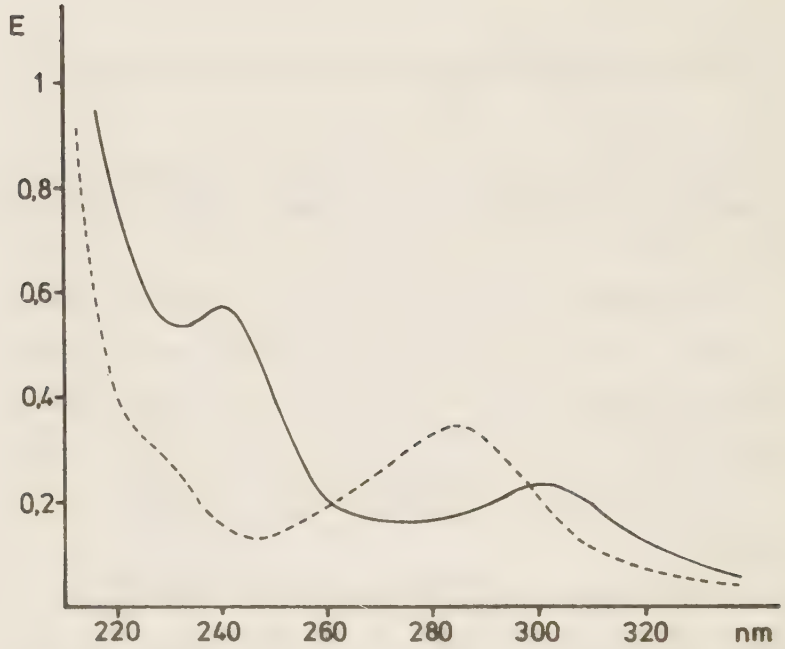


Abb. 6: UV-Spektrum von Nikkomycin in 0,05 N HCl (---) und in 0,05 N NaOH (——)

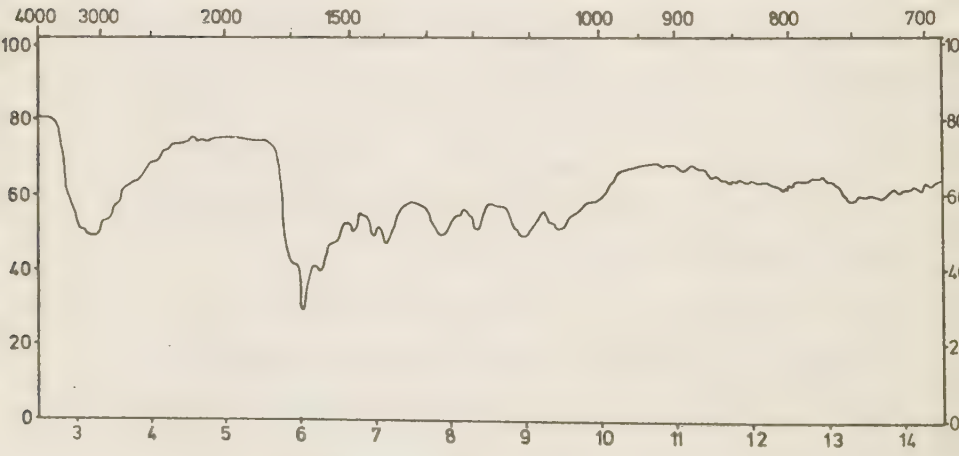


Abb. 7: IR-Spektrum von Nikkomycin (KBr)

Um die Substanz noch näher zu charakterisieren, wurde auch ihr Retentionsvolumen an einem im Einsäulenverfahren arbeitenden Aminosäureanalysator der Firma Beckman bestimmt (Abbildung 8). Dabei wird das Antibiotikum zwischen den Aminosäuren Phenylalanin und Lysin eluiert (Peak II/III).+) Außer diesem durch das Antibiotikum verursachten Doppelpeak wird gleich am Anfang, im sauren Bereich, eine geringe Menge eines Zersetzungsproduktes (I) eluiert. Der letzte Peak (IV) im Chromatogramm wird durch Ammoniak verursacht.

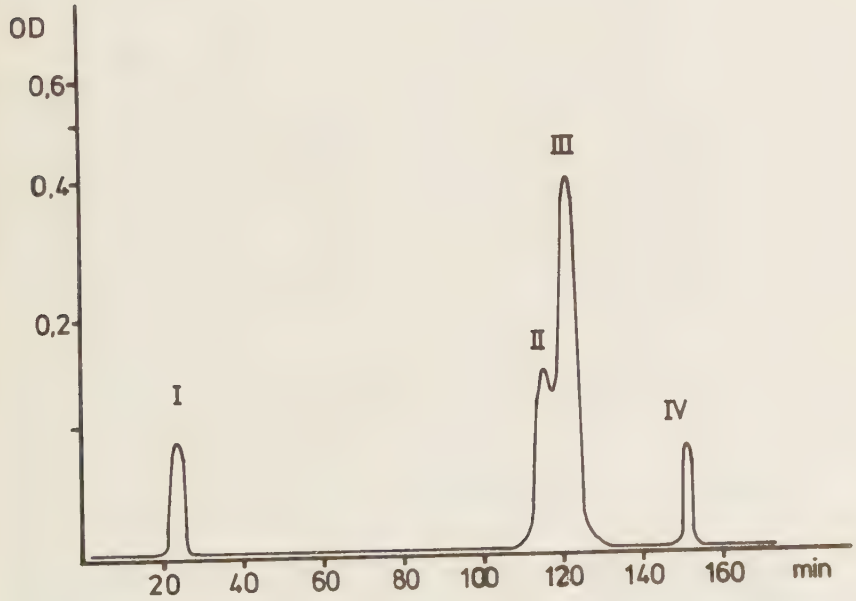


Abb. 8: Aminosäureanalyse von Nikkomycin

+) Die einzelnen Peaks in den Aminosäurenchromatogrammen werden mit Nummern versehen und die entsprechenden Substanzen im Text jeweils mit denselben Nummern bezeichnet.

2.4 Untersuchungen zur Strukturaufklärung von Nikkomycin

2.41 Hydrolysen

Orientierende Untersuchungen mit Hilfe spektroskopischer und massenspektrometrischer Methoden an der Gesamtsubstanz Nikkomycin ergaben zunächst keine interpretierbaren Hinweise auf die Gesamtstruktur des Moleküls. Da sich schon im Laufe der Untersuchungen zur Isolierung des Nikkomycins gezeigt hatte, daß die Substanz in saurem Medium hydrolyseempfindlich ist, wurde versucht, diese Eigenschaft des Nikkomycins für eine Strukturaufklärung auszunutzen.

2.411 Totalhydrolyse mit Säure im analytischen Maßstab

Bei der Hydrolyse des Antibiotikums in 6 N HCl bei 110°C färbte sich die anfangs klare, nur schwach gelbe Lösung immer dunkler und es bildete sich ein schwarzer Niederschlag. Das Dünnschichtchromatogramm des Hydrolysats zeigte zahlreiche Ninhydrin-positive Flecke, deren Identifizierung nicht versucht wurde.

Die vom gleichen Hydrolysat angefertigte Aminosäureanalyse (Abbildung 9) unterschied sich deutlich von der Analyse der Gesamtsubstanz (Abbildung 8). Der Peak II/III nach einer Elutionszeit von 130 Minuten, der durch das Antibiotikum verursacht wurde, trat nicht mehr auf. Dagegen war der Ammoniakpeak (IV) auffallend hoch. Peak V (t = 40 Min.) und Peak VI (t = 58 Min.) haben die gleichen Elutionszeiten wie die Aminosäuren Glutaminsäure und Glycin. Der kleine Peak VII (t = 120 Min.) und der danebenliegende Peak VIII

(t = 124 Min.) haben etwa die gleiche Elutionszeit wie Phenylalanin und Tyrosin.

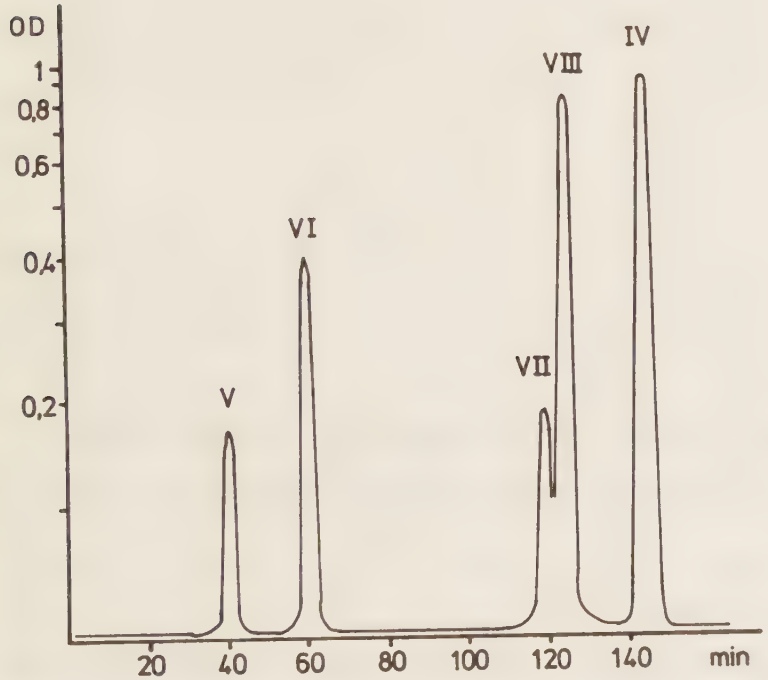


Abb. 9: Aminosäureanalyse des Totalhydrolysats von Nikkomycin in 6 N HCl

2.412 Totalhydrolyse mit Säure im präparativen Maßstab

Um die in der Aminosäureanalyse eines Totalhydrolysats von Nikkomycin aufgetretenen Ninhydrin-positiven Substanzen identifizieren zu können, wurde die Hydrolyse im 100-mg-Maßstab wiederholt und das Hydrolysat nach Abtrennung des schwarzen Niederschlages am Kationenaustauscher Beckman M-72 mit Pyridinacetat-Puffergradienten chromatographiert. Neben einer

im Ausschlußvolumen eluierten rot gefärbten Substanz (IX) wurden drei weitere Ninhydrin-positive Substanzen in geringen Mengen (jeweils 3 bis 5 mg) isoliert. Wie sich durch Aminosäureanalyse zeigte, entsprachen zwei Substanzen den Peaks V und VI in Abbildung 8 und die dritte Substanz ergab die Peaks VII und VIII, war also ein Gemisch zweier Verbindungen.

2.413 Partialhydrolyse mit 12 N HCl

Da bei der Totalhydrolyse die Ausbeute an definierten Fragmenten sehr schlecht war, wurde das Antibiotikum nun unter schonenderen Bedingungen hydrolysiert, und zwar mit 12 N HCl bei 37°C. Auch hierbei färbte sich die Nikkomycinlösung wieder schwarz. In Wasser unlösliche Bestandteile wurden abfiltriert und das Hydrolysat an Biogel P-6 unter Ausnutzung von Adsorptionseffekten aufgetrennt. Die Peaks 1 bis 6 wurden mit Wasser eluiert, die Peaks 7 und 8 mit 1 %iger Essigsäure.

Die nach dem Gefriertrocknen erhaltenen Substanzen aus den Elutionsvolumina der Peaks 1 bis 6 wurden nicht weiter untersucht, da sie nur in ganz geringer Menge anfielen und zum Teil auch nicht Ninhydrin-positiv waren. Die aus Peak 6 erhaltene Substanz entsprach Peak I in Abbildung 8. Peak 8 erwies sich als anorganisches Salz. Zunächst wurde nur die Substanz aus dem Elutionsvolumen von Peak 7 untersucht, die in der Aminosäureanalyse dem Doppelpeak zugeordnet werden konnte (Abbildung 9 Peak VII und VIII).

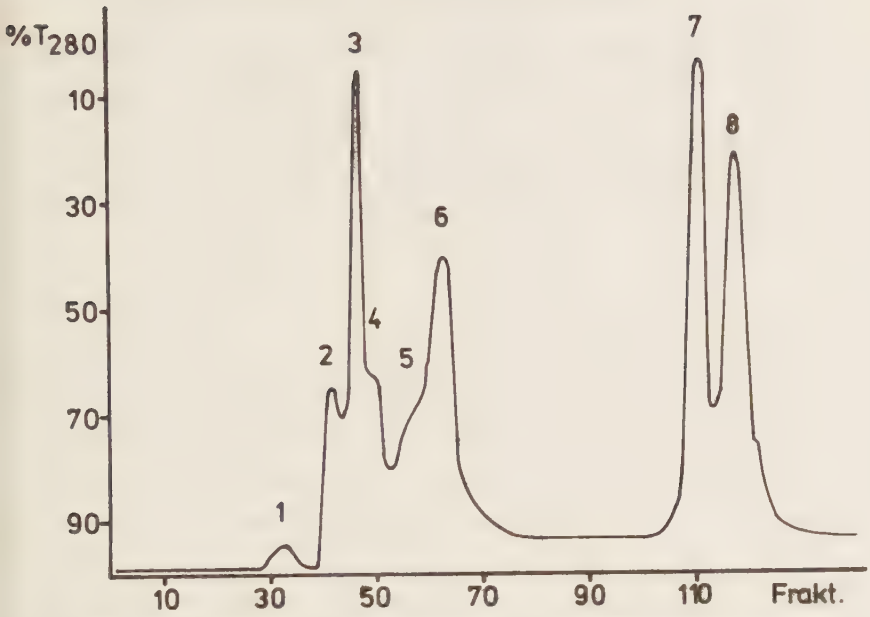


Abb. 10: Chromatographische Trennung des Partialhydrolysats von Nikkomycin an Biogel P-6

2.414 Partialhydrolyse mit 1 N Trifluoressigsäure[22)]

Das Antibiotikum Nikkomycin wurde mit 1 N Trifluoressigsäure behandelt. Nach dreistündigem Erhitzen bei 100°C zeigte das Hydrolysat keine Aktivität mehr. Auf der Celluloseplatte waren nach dem Chromatographieren im Fließmittelsystem Nr. 1 nur noch die Flecke der Substanzen I und VII/VIII zu erkennen.

Das Hydrolysat wurde am Ionenaustauscherharz Beckman M-72 mit Pyridinacetat-Puffer chromatographiert. Die bei einem Elutionsvolumen von etwa 70 ml eluierten Ninhydrin-positiven Fraktionen wurden gesammelt und gefriergetrocknet.

Das Hauptprodukt bei dieser Hydrolyse war eine Substanz, die im Aminosäurechromatogramm einen Peak nach der Elutionszeit t = 24 Minuten (siehe Peak I in Abbildung 8) und im Dünnschichtchromatogramm den Rf-Wert 0,1 zeigte. Außerdem wurde noch eine geringe Menge der Substanz VII/VIII isoliert.

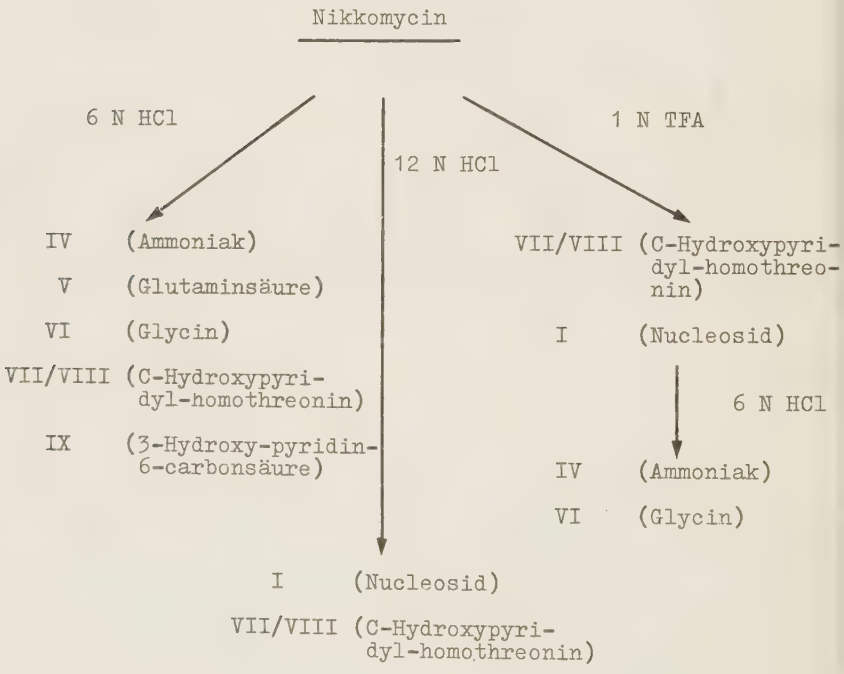


Abb. 11: Hydrolysenschema

2.42 Präparative Dünnschichtchromatographie

Da auch reine Produkte bei der Dünnschichtchromatographie im Fließmittelsystem Äthanol : Eisessig : Wasser (4:1:1) auf Celluloseplatten stets drei Ninhydrin-positive Flecken gaben, wurden diese mit Hilfe der präparativen DC getrennt und zur Identifizierung isoliert.

Wie sich durch Analyse der den Rf-Werten 0,1, 0,3 und 0,5 entsprechenden und mit Wasser eluierten Substanzen am automatischen Aminosäureanalysator zeigte, entspricht der Fleck mit Rf = 0,1 dem Peak I, der Fleck mit Rf = 0,3 dem Peak II/III, ist also Nikkomycin selbst, was sich auch aus dem Bioautogramm schließen ließ, und der Fleck mit Rf = 0,5 dem Peak VII/VIII.

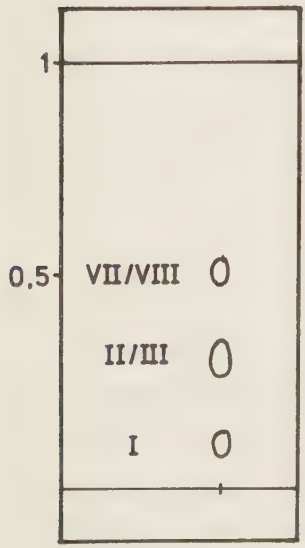


Abb. 12: Dünnschichtchromatogramm von Nikkomycin
Fließmittel:
Äthanol:Eisessig:Wasser

2.5 Identifizierung der isolierten Fragmente

2.51 Ermittlung der Struktur der Substanz VII/VIII

Die Substanz VII/VIII wurde aufgrund ihrer positiven Reaktion mit Ninhydrin aus den verschiedenen Hydrolysaten und bei der Dünnschichtchromatographie von Nikkomycin isoliert und mit Hilfe des automatischen Aminosäureanalysators identifiziert.

Sie zeigt keine Aktivität gegen die Testorganismen. Auch fällt die Reaktion mit Natriummetaperjodat-Benzidin negativ aus.

Gegen Säure ist die Verbindung sehr stabil. Auch nach verschärften Hydrolysebedingungen (6 N HCl, 110°C, 48 Std.) waren in der Aminosäureanalyse und im Dünnschichtchromatogramm keine Zersetzungsprodukte erkennbar.

Da aus den Hydrolysaten immer nur eine ganz geringe Menge an VII/VIII isoliert werden konnte, mußte die Strukturaufklärung in erster Linie durch Interpretation von Massenspektren erfolgen.

Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte durch Vergleich des Massenspektrums eines Derivates, das nach Umsetzung mit Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid erhalten wurde, mit dem Spektrum des Perdeuterio-TMS-Derivates. Außerdem wurde eine exakte Massenbestimmung einzelner Fragment-Ionen mit Hochauflösungsmassenspektrometrie durchgeführt. Die Zuordnung erfolgte dabei aufgrund der Verschiebungen in den Massenzahlen, die durch die mit Substituenten

bzw. Isotopen markierten funktionellen Gruppen verursacht werden (Tabelle 2).

TMS-Derivat	Massenzahl (m/e) Exakte Masse / Summenformel	$TMSd_9$	TMS/OMe	Interpretation
514	-	550	456	M^+
499	-	532	441	M - CH_3
409	-	433	409	M - (CH_3+ROH) +)
397	$C_{18}H_{37}N_2O_2Si_3$ gem. 397,2171 ber. 397,2163	424	397	M - COOR
307	$C_{15}H_{27}N_2OSi_2$ gem. 307,1663 ber. 307,1663	325	307	M - (TMSOH+COOR)
296	-	314	296	M - TMS-NH-CH-COOR
269	$C_{12}H_{23}NO_2Si_2$ gem. 269,1261 ber. 269,1267	287	269	M - CH_3-CH=C-COOR (NH-TMS)
253	-	268	253	269 - CH_4
218	-	236	160	TMS-NH=CH-COOR

+) R = -TMS, $-CH_3$

Tab. 2: Interpretation der wichtigsten Ionen in den Massenspektren der TMS-Derivate von Substanz VII/VIII

Das Massenspektrum des TMS-Derivats (Abbildung 13) ergibt einen Molekülpeak bei m/e 514. Beim $TMSd_9$-Derivat ist die Massenzahl des Molekül-Ions um 36 Masseneinheiten nach

m/e 550 verschoben. Daraus ist ersichtlich, daß im Molekül 4 TMS-Gruppen vorliegen und somit das Molekulargewicht von Substanz VII/VIII 226 ist.

Aus dem TMS-Derivat geht außerdem hervor, daß es sich bei der Verbindung um eine α-Aminosäure handelt; dies läßt sich aus dem Auftreten eines Fragment-Ions mit der Masse m/e 218 erkennen.

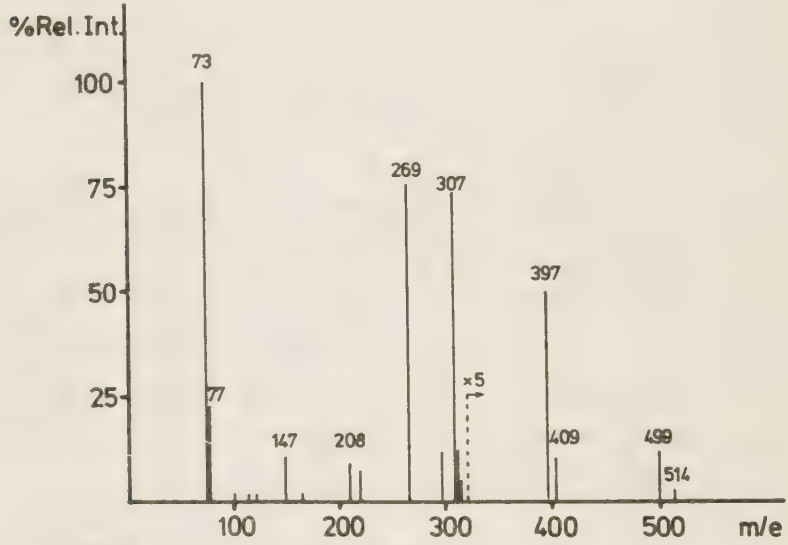


Abb. 13: Massenspektrum des TMS-Derivates der Substanz VII/VIII

Auf das Vorliegen einer Carboxylgruppe kann man aufgrund der Massendifferenz von 58 schließen, die der silylierte Methylester (Molekulargewicht 456) gegenüber dem TMS-Derivat aufweist.

Die exakte Massenbestimmung durch Hochauflösungsmassenspektrometrie (Tabelle 2) ergibt für m/e 397 die Summenformel

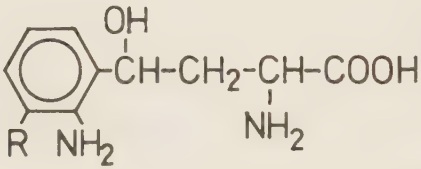
$C_{18}H_{37}N_2O_2Si_3$, für m/e 307 die Summenformel $C_{15}H_{27}N_2OSi_2$ (397 - TMSOH) und für m/e 269 die Summenformel $C_{12}H_{23}NO_2Si_2$. Für das Molekül-Ion (397 + COOTMS) ergibt sich somit die Summenformel $C_{22}H_{46}N_2O_4Si_4$ und nach Abzug der eingeführten TMS-Gruppen für die Substanz VII/VIII die Summenformel $C_{10}H_{14}N_2O_4$.

Im Gaschromatogramm des TFA-Derivats der Substanz VII/VIII fällt auf, daß ein Hauptpeak und 3 Nebenbanden auftreten, die sich in ihren Massenspektren nur durch geringe Intensitätsabweichungen unterscheiden. Daraus ist zu schließen, daß es sich um 4 Diastereomere handelt und damit das Molekül mindestens 2 chirale Zentren enthält.

Außerdem tritt im Gaschromatogramm ein Nebenprodukt auf mit dem Molekulargewicht 414, das sich aus dem Hauptprodukt (MG 528) durch Abspaltung eines Trifluoressigsäuremoleküls bildet, was für die Gegenwart einer aliphatischen Hydroxylgruppe spricht. Außerdem fällt in diesem Spektrum ein intensives Ion bei m/e 399 auf (M - 15), was als Hinweis für eine Methylverzweigung gelten kann.

Nachdem das Molekulargewicht und die Summenformel der Verbindung bekannt waren und auch feststand, daß es sich um eine α-Aminosäure handelt, die Substanzmenge aber für chemische Untersuchungsmethoden nicht ausreichend war, wurde als nächstes nach bereits bekannten Verbindungen mit ähnlicher Summenformel und einer aliphatischen Hydroxylgruppe gesucht.

Die beiden ersten in diesem Zusammenhang untersuchten Verbindungen waren 4-Dihydrokynurenin (R = H) und 4-Dihydrohydroxykynurenin (R = OH). Wie später beschrieben, wurden sie durch Reduktion von Kynurenin bzw. Hydroxykynurenin erhalten.



Der massenspektrometrische Vergleich der TMS-Derivate dieser Verbindungen mit den TMS-Derivaten der Substanz VII/VIII zeigte aber, daß die Fragmentierungsschemata nicht identisch sind.

Da Kynurenin und Hydroxykynurenin Abbauprodukte des Tryptophans sind, wurde weiterhin untersucht, ob es sich bei der Substanz um ein Indolderivat handeln könnte.

Es gelang nicht, Tryptophan mit den für Indolderivate geeigneten Reagenzien p-Dimethylaminobenzaldehyd und Formaldehyd[23] im Gesamtmolekül nachzuweisen. Da Tryptophan bei der Hydrolyse mit 6 N HCl zerstört wird, wurde Nikkomycin mit 4,2 N NaOH (15 Std., 110°C) alkalisch hydrolysiert[24] (Abbildung 15).

Mit den Nachweisreagenzien auf Indolderivate konnte aber auch im Hydrolysat kein Tryptophan oder Tryptophanderivat

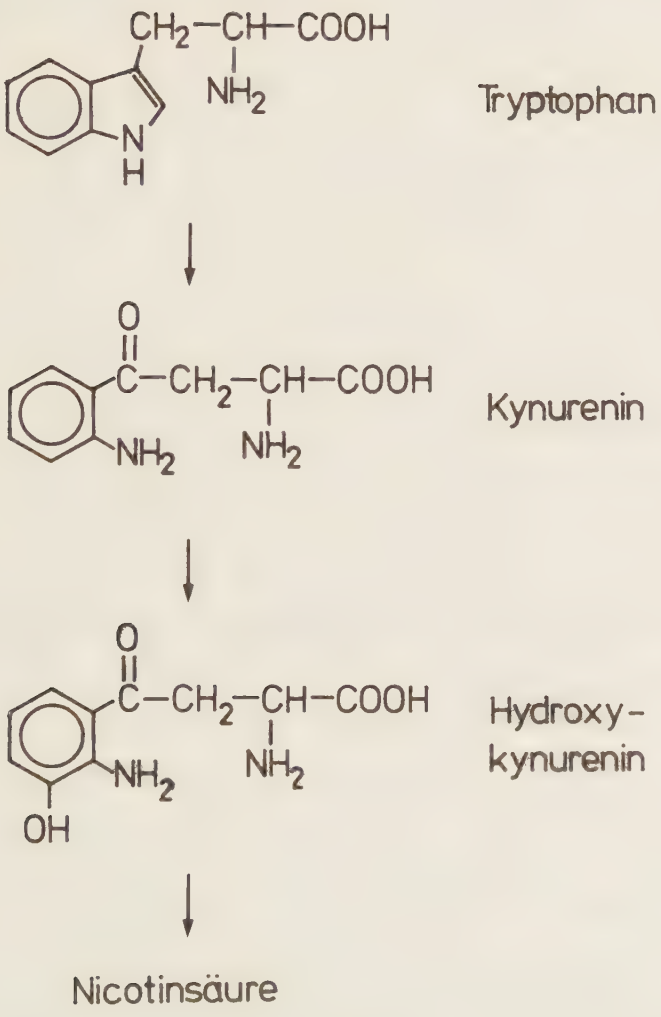


Abb. 14: Enzymatischer Abbau von Tryptophan im Organismus

nachgewiesen werden. Auch das Aminosäurechromatogramm wies keinen Peak auf, der dem Tryptophan hätte zugeordnet werden können.

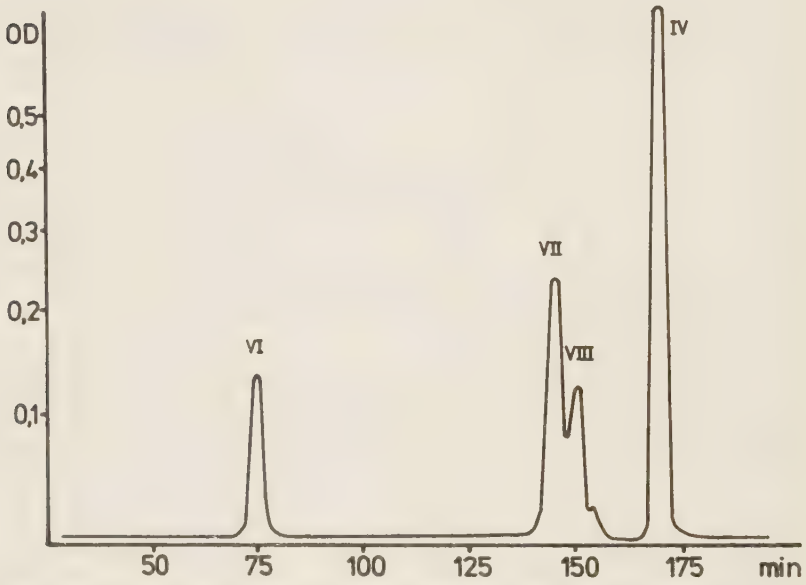
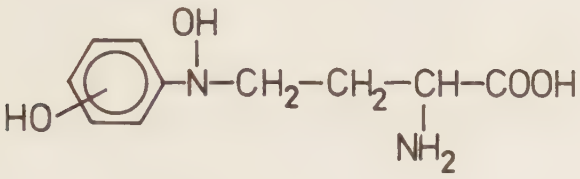


Abb. 15: Aminosäureanalyse des alkalischen Hydrolysats von Nikkomycin in 4,2 N NaOH

Peak VI:	t = 64 Min.	(Glycin)
Peak VII:	t =134 Min.	(Aminosäure)
Peak VIII:	t =138 Min.	(Aminosäure)
Peak IV:	t =156 Min.	(Ammoniak)

Die beiden Peaks VII und VIII zeigen jedoch gegenüber der sauren Hydrolyse ein umgekehrtes Verhältnis der Intensitäten. Dies läßt darauf schließen, daß während der alkalischen Hydrolyse teilweise Racemisierung stattgefunden hat.

Als weitere Möglichkeit wurde für die Substanz VII/VIII folgende Struktur angenommen:

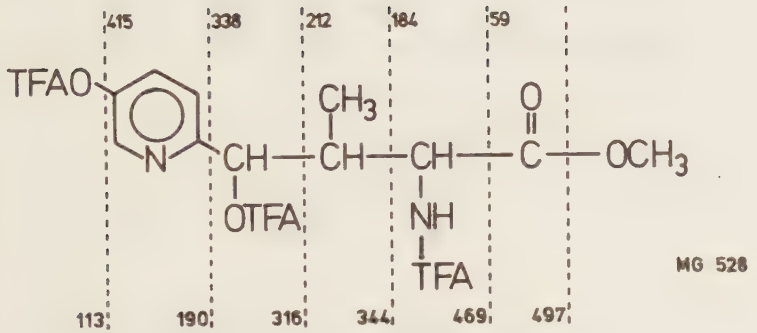


Bei den verschiedenen später beschriebenen Syntheseversuchen zeigte sich aber, daß N-Alkyl-N-Arylhydroxylamine nur schwer zugänglich sind. Auch konnte die N-OH-Gruppierung bei weiteren Untersuchungen der Substanz VII/VIII nicht nachgewiesen werden; z.B. ließ sich durch ESR-Spektroskopie ein nach Oxidation zu erwartendes Nitroxyl-Radikal nicht nachweisen.

Die endgültige Klärung der Struktur der Substanz VII/VIII erfolgte durch die massenspektrometrische Untersuchung von Derivaten, die durch verschiedene spezifische Derivatisierungsreaktionen erhalten wurden. Setzt man die Aminosäure (VII/VIII) vor der Silylierung mit Diazomethan um, so wird die Carboxylgruppe und außerdem eine weitere funktionelle Gruppe methyliert (M^+ = m/e 398). Dabei wird der Basispeak um 58 Masseneinheiten von m/e 269 nach m/e 211 verschoben; daraus kann man auf die Methylierung einer sauren Hydroxylgruppe an einem aromatischen oder heterocyclischen System schließen.

Massenzahl m/e	Interpretation	Übergangs-Signal m*
528	M	
509	M - F	
497	M - OCH_3	
469	497 - CO	442
459	M - CF_3	397
443	M - ($COOCH_3$ + HCN)	
415	M - TFAO	
414	M - TFAOH	
383	415 - CH_3OH	354
355	469 - TFAOH 383 - CO	270 329
344	M - TFA-NH-CH-$COOCH_3$	
317	M - CH_3-CH=C-$COOCH_3$ NHTFA	
301	M - (TFAOH + TFAO)	
243	M - (TFAO + TFAO + $COOCH_3$)	
242	M - (TFAOH + TFAO + $COOCH_3$)	
230	344 - TFAOH	153,5
220	317 - TFA	
190	TFA-O-	

Tab. 3: Interpretation der wichtigsten Ionen im Massenspektrum der Substanz VII/VIII nach Veresterung und Trifluoracetylierung



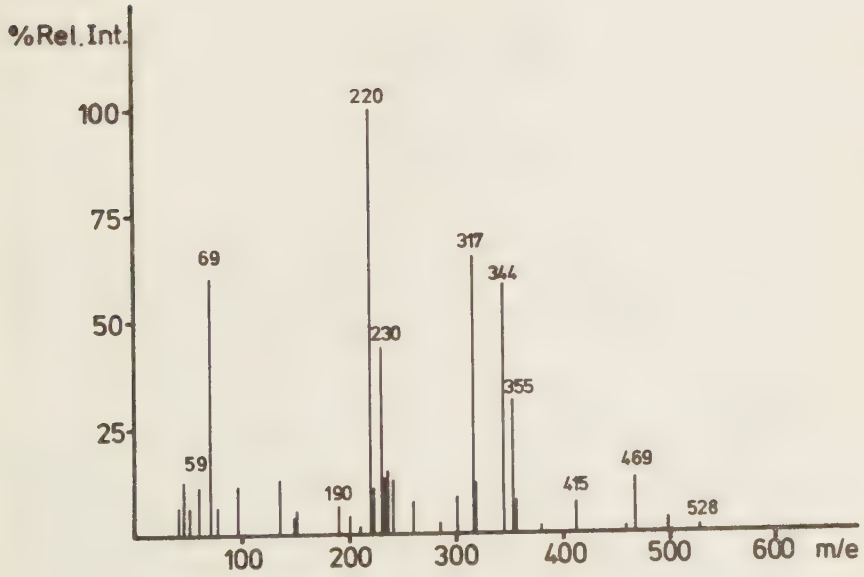
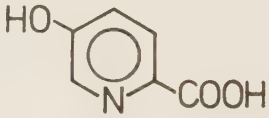
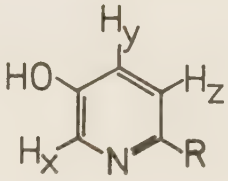


Abb. 16: Massenspektrum und Fragmentierungsschema der Substanz VII/VIII nach Veresterung und Trifluoracetylierung

Die bei der präparativen Aufarbeitung des Totalhydrolysats als Nebenprodukt isolierte rote Substanz (IX) wurde in Form ihres TMS- und TFA-Derivats als 3-Hydroxypyridin-6-carbonsäure identifiziert.

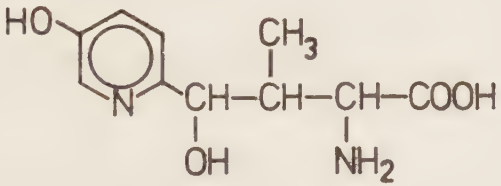


Die Substitution am Pyridinring kann mit Hilfe des NMR-Spektrums der Gesamtsubstanz wie folgt festgelegt werden:



Auf Grund der chemischen Verschiebung (ca. 8,1 ppm) muß das isoliert stehende Proton H_x dem N-Atom benachbart sein. Die Protonen H_y und H_z zeigen eine Verschiebung von ca. 7,0 - 7,35 ppm; sie stehen in ß- bzw. γ -Stellung zum N-Atom. Das Signal bei 0,63 ppm kann der CH_3-(CH)-Gruppierung zugeordnet werden. Aus der chemischen Verschiebung geht hervor, daß die Methylgruppe weder zu einer Carbonylgruppe noch zu einem Aromaten in α-Stellung steht. Die breite, schlecht aufgelöste Signalgruppe von ca. 3,6 - 6 ppm kommt verschiedenen OH- und CH-Protonen zu.

Unter Berücksichtigung der durch Massenspektrometrie nachgewiesenen funktionellen Gruppen (Carboxylgruppe, α-Aminogruppe, Methylgruppe, aliphatische und aromatische Hydroxylgruppe), der durch Hochauflösungs-Massenspektrometrie ermittelten Summenformel und des NMR-Spektrums ergibt sich für die Substanz VII/VIII (α-Amino-ß-methyl-γ-hydroxy-(5-Hydroxy)pyridyl-(2)-buttersäure)[+] die Struktur:



2.52 Ermittlung der Struktur der Substanz I

Die Verbindung, ein gelbliches Pulver, zeigt gegen Ninhydrin und Natriummetaperjodat - Benzidin eine positive Reaktion. Die Testorganismen Mucor hiemalis (+) und (-) werden aber nicht gehemmt.

Um die Stabilität dieser Substanz, die aus dem TFA-Hydrolysat isoliert worden war, festzustellen, wurde sie eine Stunde lang mit 3 N HCl bei 100°C behandelt. Danach konnte an Hand der Aminosäureanalyse keine Zersetzung beobachtet werden. Unter schärferen Hydrolysebedingungen (6 N HCl,

[+] Die Substanz VII/VIII wird im Text von nun an auch mit C-Hydroxypyridyl-homothreonin (Hpht) bezeichnet.

110°C, 15 Std.) wurde die Substanz I zerstört. Im Aminosäurechromatogramm der Probe war nach der Elutionszeit t = 65 Min. ein Peak zu erkennen, der der Aminosäure Glycin zugeordnet werden konnte. Außerdem zeigte der Ammoniakpeak wieder eine besonders große Intensität.

Ein Vergleich mit Uracil zeigte, daß nach der Hydrolyse mit 6 N HCl hier im Aminosäurechromatogramm nur Ammoniak gefunden wurde. Der auch im Hydrolysat des Gesamtantibiotikums stets auftretende intensive Ammoniakpeak kann also auf die Zersetzung von im Molekül enthaltenem Uracil, das auch massenspektrometrisch identifiziert werden konnte, zurückgeführt werden.

Das Ultraviolett-Absorptionsspektrum der Substanz I zeigt, gemessen in 0,05 N HCl, ein Maximum bei 262 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 232); in 0,05 N NaOH verschiebt sich das Absorptionsmaximum geringfügig nach 264 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 165).

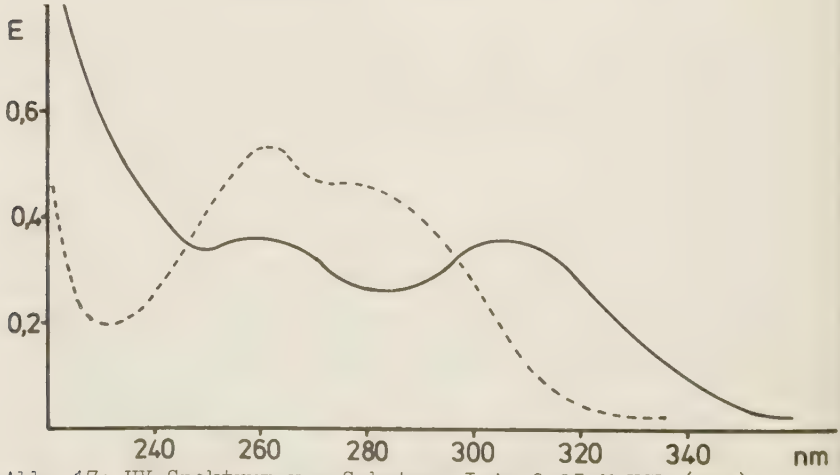
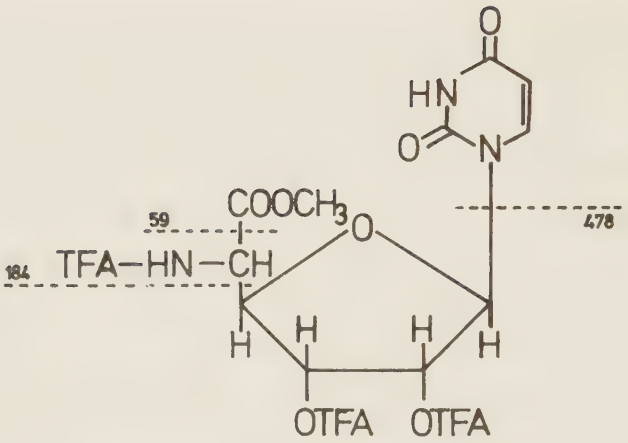


Abb. 17: UV-Spektrum von Substanz I in 0,05 N HCl (---) und in 0,05 N NaOH (——)

Das Massenspektrum von Substanz I nach der Veresterung mit Methanol / Salzsäure und Trifluoracetylierung ist in Abbildung 18 wiedergegeben. Zur Bestimmung der Anzahl der eingeführten TFA-Gruppen wurde ein Pentafluorpropionylderivat (PFP) hergestellt. Dabei verschiebt sich die Massenzahl des Molekül-Ions um 150 Masseneinheiten von m/e 589 nach m/e 739; dies läßt erkennen, daß 3 Acylgruppen aufgenommen wurden. Die Gegenwart einer Carboxylgruppe in Substanz I wird durch die Abspaltung von OCH_3 und $COOCH_3$ angezeigt. Charakteristisch ist beim TFA-Derivat auch die Abspaltung von 111 Masseneinheiten vom Molekül-Ion nach m/e 478 bzw. m/e 628 beim PFP-Derivat. Diese Massendifferenz entspricht dem Uracilrest[25,26]. Wichtig ist noch das Auftreten des Fragment-Ions m/e 112, das dem protonierten Uracilrest entspricht. Das Fragment der Masse m/e 478 entspricht einem Methylester eines Amino-Uronsäurerestes mit drei TFA-Gruppen. Die 5'-Stellung der Aminogruppe läßt sich aus dem Fragment m/e 405 ableiten.

Zu diesem Zeitpunkt lag es nahe, das TFA-Derivat von Substanz I mit dem entsprechenden Derivat von Polyoxin C[27] zu vergleichen, das anstelle von Uracil 5-Hydroxymethyluracil und außerdem einen 5-Desoxy-5-amino-alluronsäurerest enthält. Dabei ist festzustellen, daß das Massenspektrum von Polyoxin C nach Veresterung und Trifluoracetylierung Fragmentierungen aufweist, die denen von Substanz I analog sind. Für Polyoxin konnten K. Isono et al.[28] zeigen, daß sich die 5-Desoxy-5-aminouronsäure von der Allose ableitet.



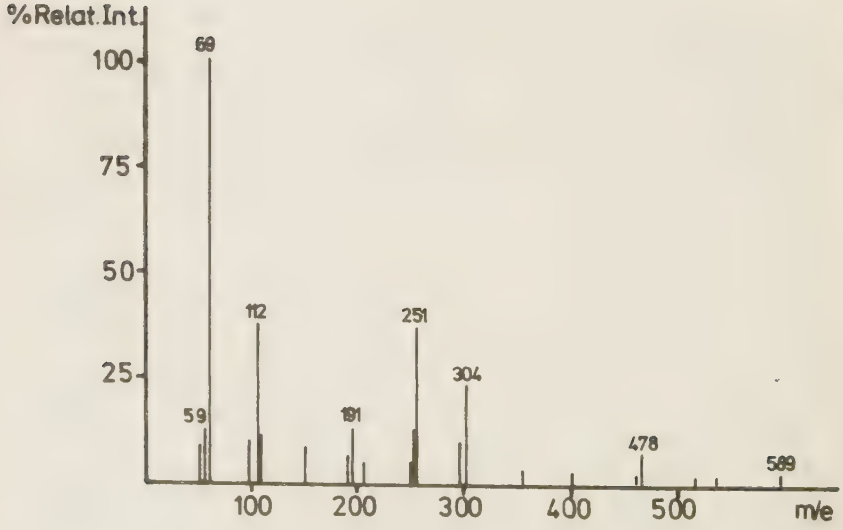


Abb. 18: Massenspektrum der Substanz I nach Veresterung und Trifluoracetylierung

Massenzahl m/e	Interpretation
589	M^+
570	M - F
530	M - $COOCH_3$
478	M - Uracil
475	M - TFAOH
405	M - ($COOCH_3$ + CH-NH-TFA)
364	M - (TFAOH + Uracil)
304	405 - Uracil
291	405 - TFAOH
251	364 - $TFANH_2$
250	364 - TFAOH
248	291 - HNCO
191	M - (Uracil+$COOCH_3$+2TFAOH)
112	Uracil + H

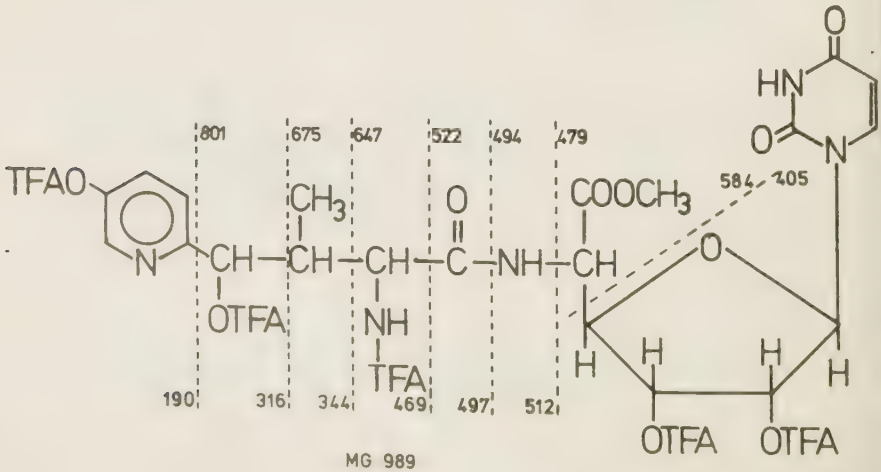
Tab. 4: Interpretation der wichtigsten Ionen im Massenspektrum der Substanz I nach Veresterung und Trifluoracetylierung

Bei der Untersuchung der Substanz I konnte zwar eine Ähnlichkeit des Zuckerfragments mit 5-Desoxy-5-aminouronsäure festgestellt werden, identisch sind die beiden Zucker jedoch nicht.

2.53 Struktur des Antibiotikums Nikkomycin

Da nun feststand, daß Nikkomycin aus C-Hydroxypyridyl-homothreonin (VII/VIII) und dem Nucleosid (I) aufgebaut ist, blieb noch festzustellen, wie diese Teilstrukturen miteinander verknüpft sind. Da das Gesamtmolekül sehr labil ist, gelang die Herstellung eines flüchtigen Derivates erst unter Anwendung schonender Reaktionsbedingungen. Nach der Methylierung mit Methanol / Salzsäure und Trifluoracetylierung bei Raumtemperatur zeigt das Massenspektrum (Abbildung 19) einen Molekülpeak bei m/e 989. Aus den Fragment-Ionen der Massenzahlen 497 und 469 geht hervor, daß die Aminosäure (Hpht) N-terminal mit dem Nucleosid verknüpft ist. Das Ion m/e 878 entsteht durch Abspaltung des Uracilrestes vom Molekül-Ion.

Eine Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen zeigt Tabelle 5. Im Massenbereich unter m/e 500 überlagern sich die Fragmentierungen der Aminosäure (m/e 497, 469, 355, 344, 317, 230, 220) und die des Nucleosids (m/e 364, 251, 191).



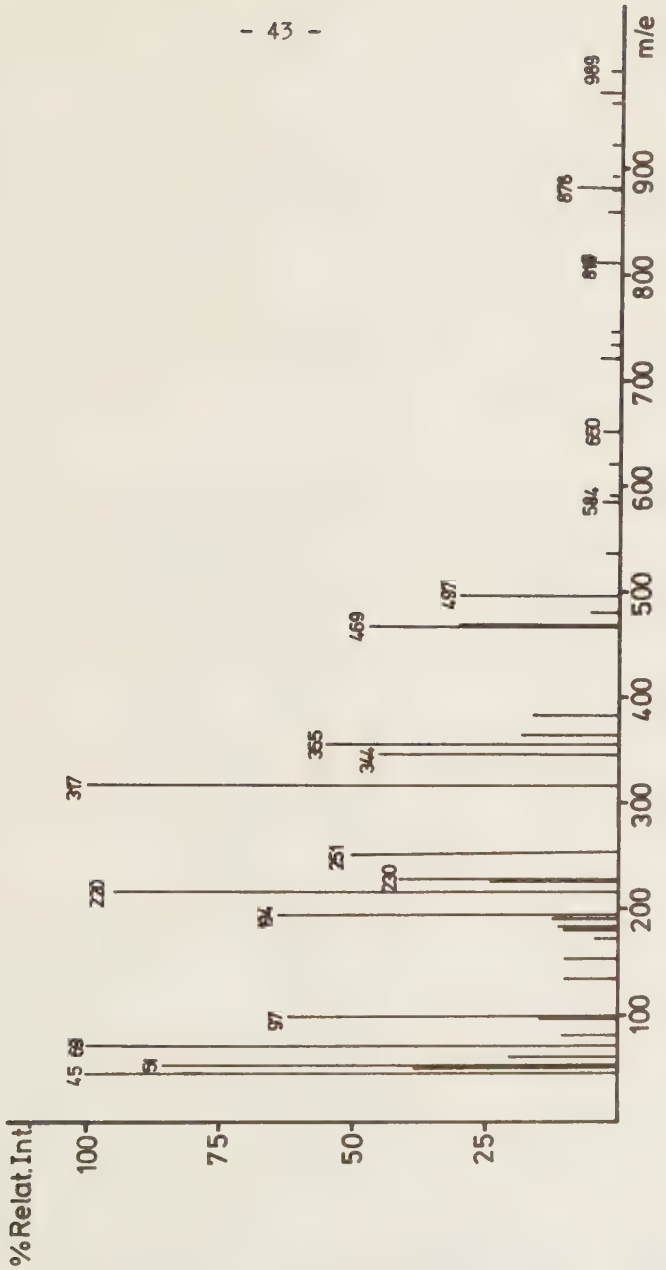


Abb. 19: Massenspektrum von Nikkomycin nach Veresterung und Trifluoracetylierung

Massenzahl m/e	Interpretation
989	M^+
972	M - F
960	M - OCH_3
932	M - $COOCH_3$
922	M - CF_3
878	M - TFAO
877	M - TFAOH
858	M - (TFAOH + F)
818	M - (TFAOH + $COOCH_3$)
744	M - (2 TFAOH + F)
736	M - (TFAO + TFAOH + CO)
724	M - (TFA-O-CH-CH-OTFA + O)
650	M - (TFAO + 2 TFAOH)
622	736 - TFAOH
590	M - (3 TFAOH + $COOCH_3$)
584	Siehe Schema
536	650 - TFAOH
497	Siehe Schema
478	Siehe Schema
469	Siehe Schema
383	497 - TFAOH
364	478 - TFAOH
355	469 - TFAOH
344	Siehe Schema
317	Siehe Schema
251	364 - TFAO
230	344 - TFAOH
220	317 - TFA

Tab. 5: Interpretation der wichtigsten Ionen im Massenspektrum von Nikkomycin nach Veresterung und Trifluoracetylierung

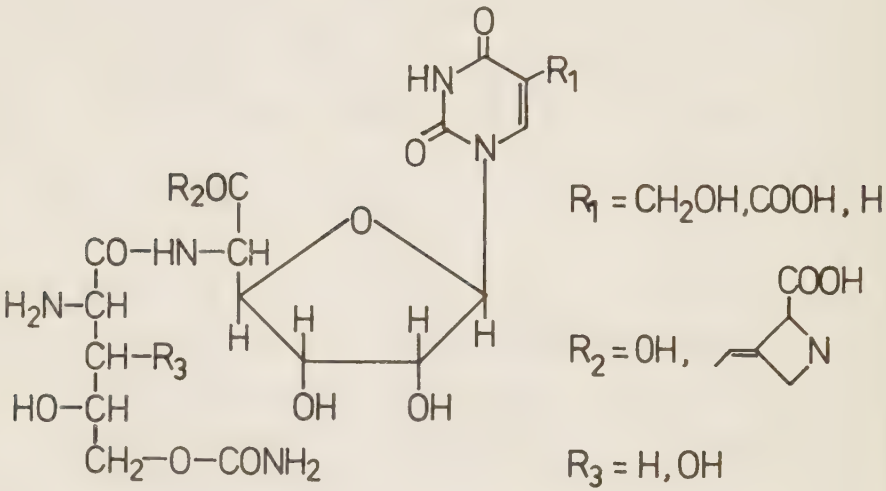
2.6 Vergleich von Nikkomycin mit den Polyoxinen

Die Wirksamkeit gegen phytopathogene Pilze und die Ausbildung von keulenartigen Wucherungen an den Hyphenspitzen von Pilzen ließen schon vermuten, was durch die chemischen und physikalischen Untersuchungen bestätigt werden konnte: Nikkomycin ist ein neues Antibiotikum, das zu den Polyoxinen, einer Gruppe von Nucleosid - Peptid - Antibiotika, gehört.

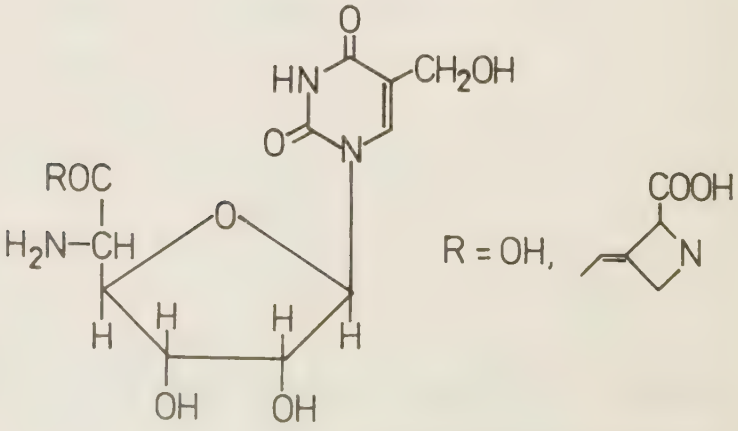
Die beiden ersten Polyoxine, Polyoxin A und B, wurden 1965 von den japanischen Wissenschaftlern S. Suzuki, K. Isono und deren Mitarbeitern in dem Kulturfiltrat von Streptomyces cacaoi entdeckt[29]. In den darauffolgenden Jahren isolierten sie noch zwölf weitere Verbindungen mit ähnlichen Summenformeln, die Polyoxine C - O [30-34], und ermittelten die Strukturen der Polyoxine A - M [33,35-37]. Sie hydrolysierten die jeweilige Substanz, trennten die entstandenen Bruchstücke und untersuchten sie mit chemischen und spektrometrischen Methoden. Die Forschergruppe stellte fest, daß jedes Polyoxin als Chromophor einen Pyrimidinabkömmling, meist ein an C-5 substituiertes Uracil, enthält, außerdem eine 5-Aminofuranose-Verbindung und eine α-Aminosäure, Polyoxamsäure oder Deoxypolyoxamsäure.

Außer den Polyoxinen C und I hemmen alle Antibiotika dieser Gruppe das Wachstum von phytopathogenen Pilzen; sie sind Hemmstoffe der Chitinsynthese. Diese Tatsache wird auf die strukturelle Ähnlichkeit der Polyoxine mit Uridindiphosphat-N-acetylglucosamin zurückgeführt[38].

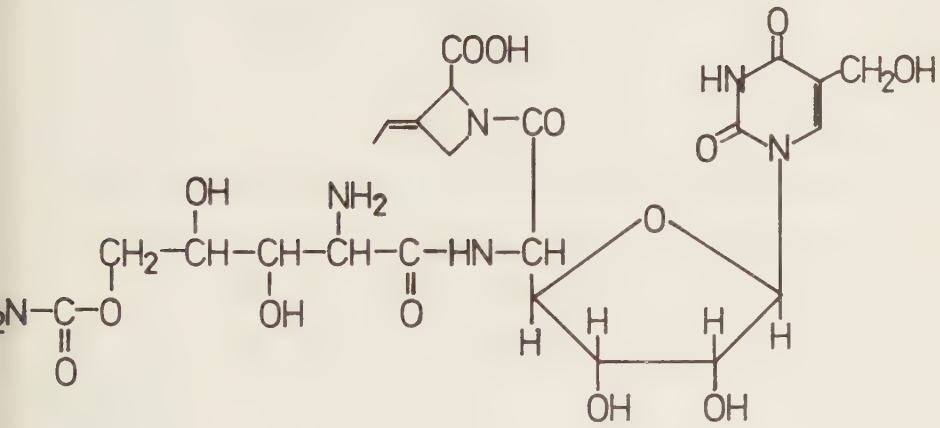
Allgemeine Formel der Polyoxine A - M, außer C und I

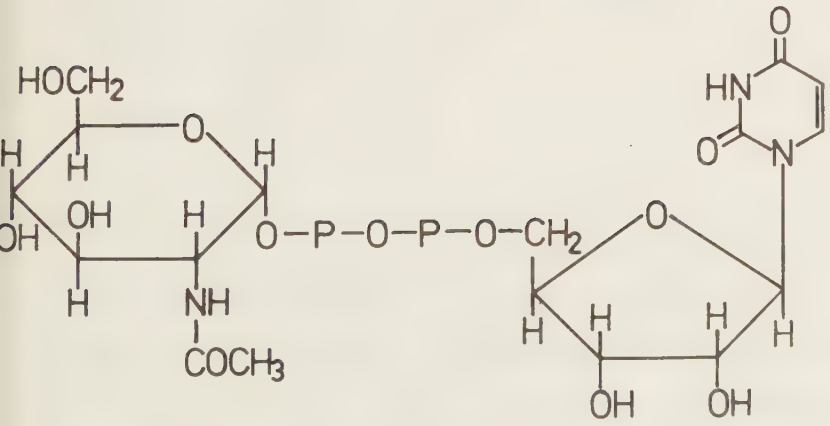


Allgemeine Formel der Polyoxine C und I



Vergleich zwischen Polyoxin A und UDP-N-acetylglucosamin[26)]

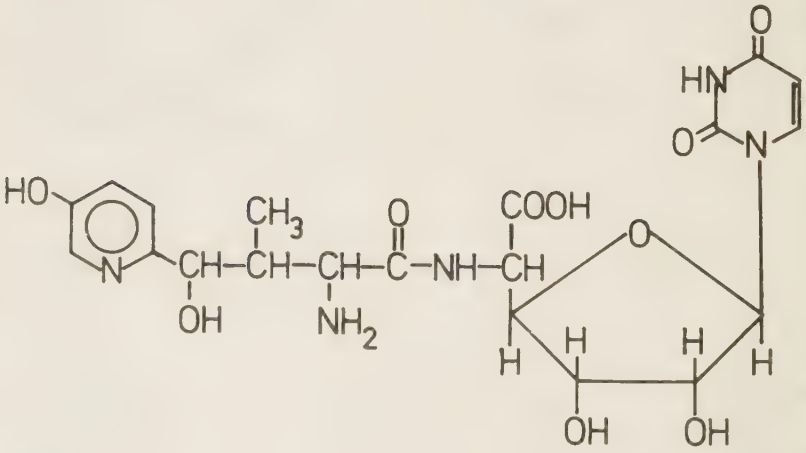




Nikkomycin ist aufgebaut aus einem Pyrimidinchromophor (Uracil), einem 5-Aminozucker, der in der Furanoseform vorliegt, und einer α-Aminosäure. Wendet man die allgemeine Formel für aktive Polyoxine auf Nikkomycin an, so ist

$$R_1 = H$$
$$R_2 = OH$$
$$R_3 = CH_3.$$

Außerdem ist der Carbamoyl-methylrest durch Hydroxypyridin ersetzt.



Nach einer Untersuchung von K. Isono, T. Azuma und S. Suzuki ist für die biologische Aktivität aller Polyoxine das Vorhandensein der Carboxylgruppe an C-5' und der Hydroxylgruppe an C-4" unerläßlich[39]. Auch diese Anforderung erfüllt Nikkomycin.

In einigen Punkten unterscheidet sich Nikkomycin jedoch von

den bisher beschriebenen Polyoxinen. So verursacht Nikkomycin eine Wachstumshemmung bei Mucor hiemalis, die übrigen Polyoxine dagegen zeigen gegenüber Mucor-, Aspergillus-, Penicillium-, Trichophyton- und Candida-Arten keine Hemmwirkung[40]. Der auffälligste Unterschied ist, daß Nikkomycin als α-Aminosäure nicht, wie die anderen Polyoxine, Polyoxamsäure oder Deoxypolyoxamsäure enthält, sondern α-Amino-ß-methyl-γ-hydroxy-γ-(5-Hydroxy)pyridyl-(2)-buttersäure. Während die Polyoxine A-M zwischen pH 1 und pH 8 stabil sind, wird Nikkomycin schon bei Zimmertemperatur bei pH 3 teilweise in die Aminosäure und das Nucleosid gespalten. Dagegen können Polyoxine schon mit 0,5 N NaOH hydrolysiert werden; bei Nikkomycin aber wird eine Spaltung erst mit 6 N NaOH erreicht. Diese letzten beiden Punkte sowie die unterschiedlichen UV-Spektren haben die Strukturaufklärung erheblich erschwert, da aufgrund dieser Tatsachen anfangs eine Polyoxin-ähnliche Struktur für Nikkomycin ausgeschlossen worden war.

2.7 3-Cyclohexenylglycin

Bei der chromatographischen Trennung des Antibiotikums Nikkomycin an der Cellulosesäule wurde außer Nikkomycin noch eine weitere Ninhydrin-positive Substanz isoliert, die das Wachstum der Testorganismen Mucor hiemalis (+) und (-) nicht hemmte, jedoch Aktivität gegen Bacillus subtilis zeigte. Die Verbindung wurde durch massenspektrometrische Untersuchung von Derivaten als 3-Cyclohexenylglycin identifiziert.

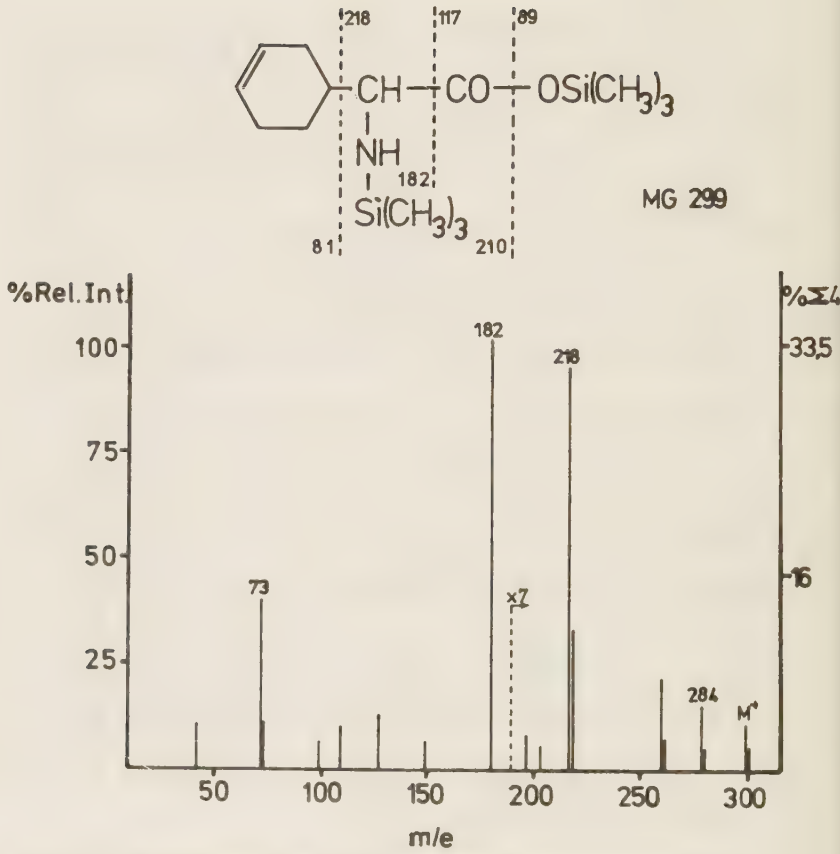


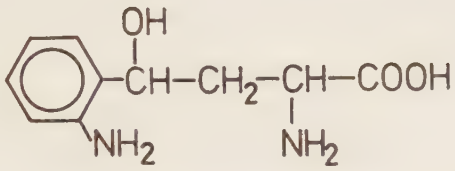
Abb. 20: Massenspektrum und Fragmentierungsschema von 3-Cyclohexenylglycin nach Trimethylsilylierung

Diese Aminosäure, die dünnschichtchromatographisch und gaschromatographisch identisch ist mit synthetischem 3-Cyclohexenylglycin[41], ist auch ein Abbauprodukt des Antibiotikums Ketomycin[42]. Im Aminosäurechromatogramm zeigt 3-Cyclohexenylglycin einen Peak nach der Elutionszeit t = 136 Minuten (Phenylalanin). Der Rf-Wert im Fließmittelsystem Äthanol:Eisessig:Wasser (4:1:1) auf Celluloseplatten ist 0,8.

2.8 Zur Synthese von C-Hydroxypyridyl-homothreonin

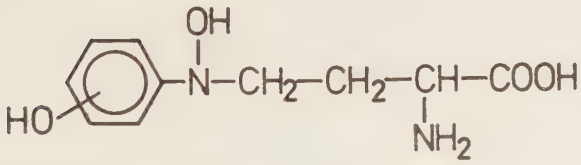
Aufgrund der mit Hochauflösungsmassenspektrometrie eindeutig bestimmten Summenformel für C-Hydroxypyridyl-homothreonin (VII/VIII) wurden, wie vorstehend beschrieben, im Laufe der Untersuchung drei verschiedene Strukturen, allerdings mit unterschiedlichem Wahrscheinlichkeitsgrad, für möglich gehalten:

1.



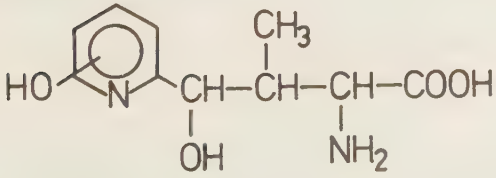
4-Dihydrokynurenin

2.



N-Hydroxyphenyl-N-α-aminobuttersäure-hydroxyl-amin

3.



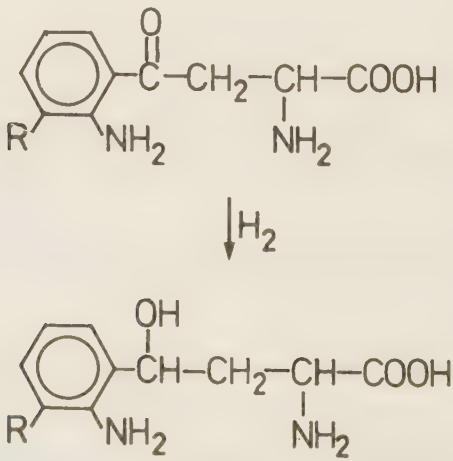
C-Hydroxypyridyl-homothreonin

Um durch Vergleich mit authentischer Substanz die eine oder andere Struktur ausschließen zu können, wurden Versuche zur Synthese dieser drei bisher nicht beschriebenen Verbindungen unternommen.

Die Zwischenstufen und Endprodukte wurden massenspektrometrisch charakterisiert.

2.81 Synthese von 4-Dihydrokynurenin und 4-Dihydrohydroxykynurenin

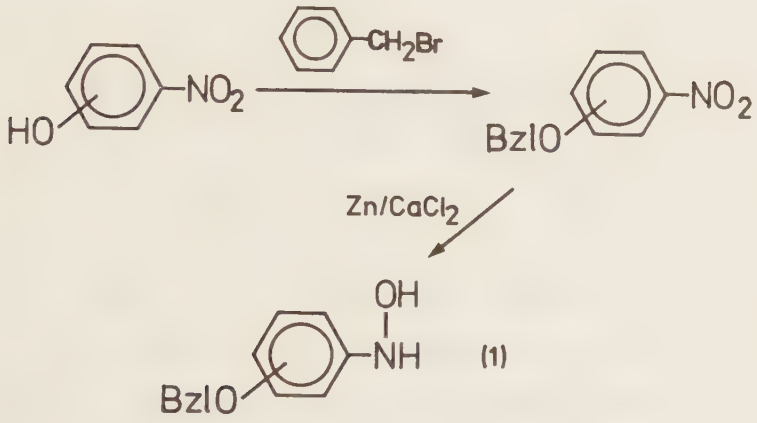
4-Dihydrokynurenin (R=H) und 4-Dihydrohydroxykynurenin (R=OH) waren durch Reduktion von Kynurenin bzw. Hydroxykynurenin mit Natriumborhydrid in guten Ausbeuten darstellbar.



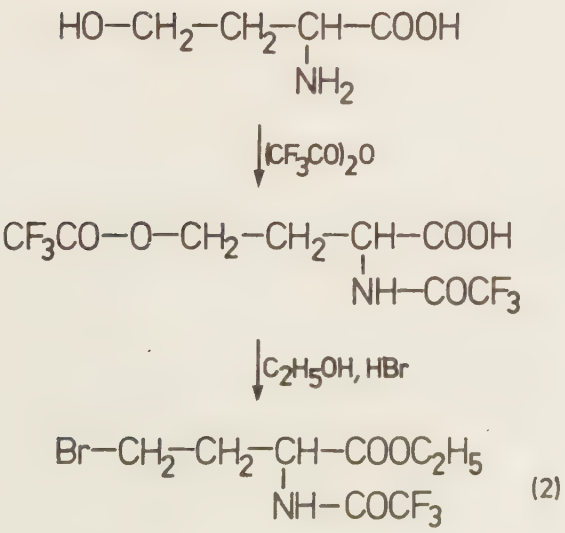
Die Verbindungen wurden durch Massenspektrometrie identifiziert und ihre Identität mit der Aminosäure C-Hydroxypyridyl-homothreonin ausgeschlossen.

2.82 N-Hydroxyphenyl-N-α-aminobuttersäure-hydroxylamin

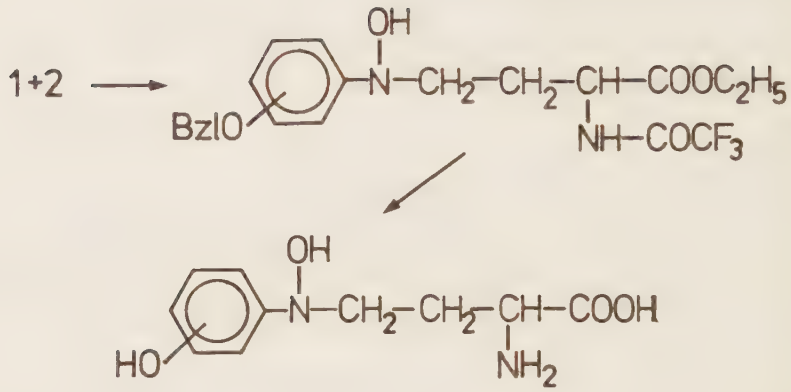
1. Synthesevorschlag



(1)



(2)

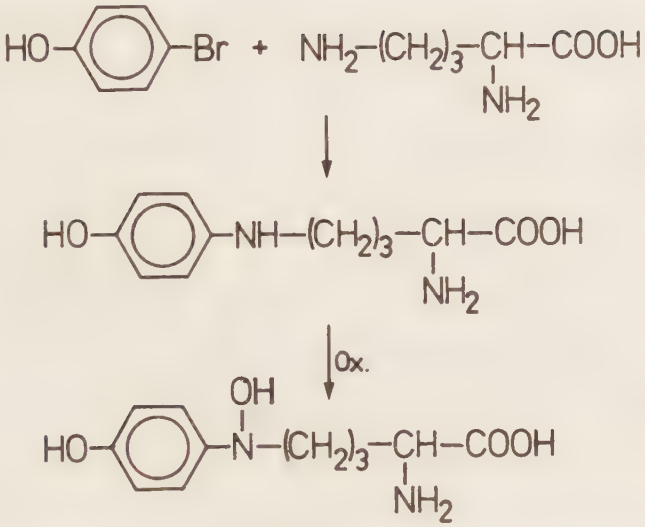


Die Darstellung von m- und p-O-Benzyloxyphenylhydroxylamin[43] durch Reduktion der O-Benzylnitrophenole war gut durchführbar. Bei o-O-Benzylnitrophenol blieb die Reaktion jedoch nicht auf der Hydroxylaminstufe stehen, sondern führte gleich zum Amin.

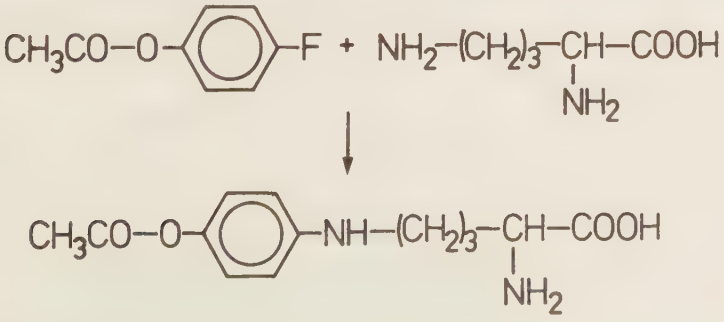
Auch die zweite Komponente (2) war nach einer Vorschrift von E. Bayer et al.[44] gut erhältlich.

Nach der Reaktion von (1) und (2) konnten im Hydrolysat, das über Ionenaustauscherharz aufgetrennt worden war, an Ninhydrin-positiven Substanzen nur Homoserin und Homoserinlacton nachgewiesen werden. Auch die Aminosäureanalyse des Hydrolysats zeigte keinen Peak an der Stelle, an der C-Hydroxypyridyl-homothreonin (VII/VIII) eluiert wird.

2. Synthesevorschlag

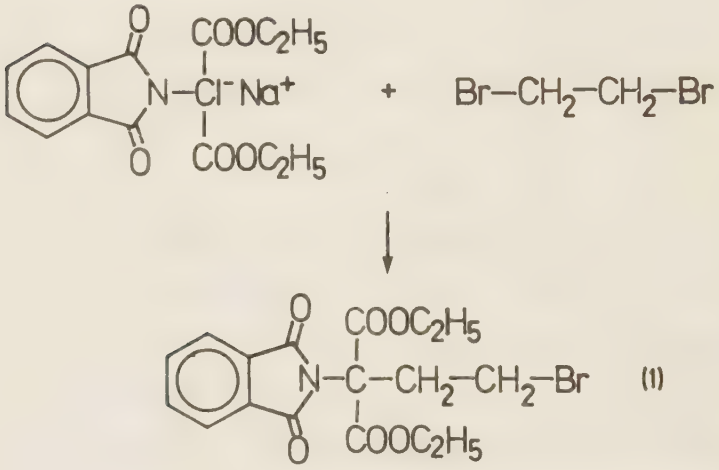


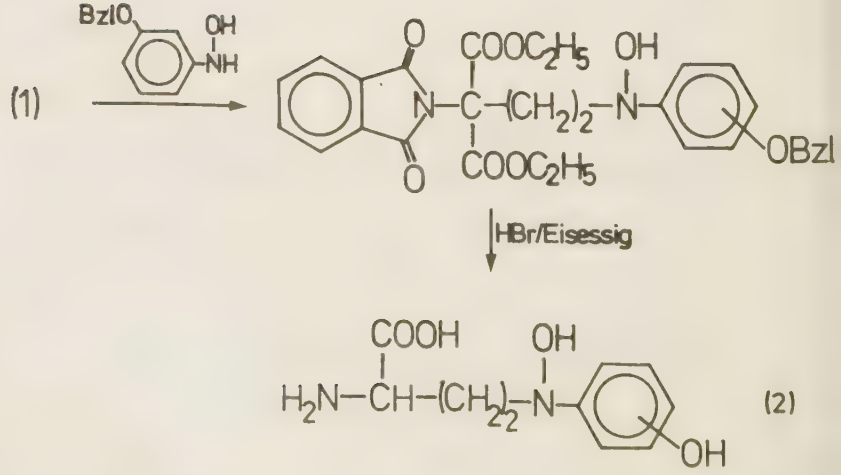
Die Aminosäure Ornithin wurde in Form ihres Kupferkomplexes[45] eingesetzt. p-Bromphenol reagierte nicht mit dem Ornithinkomplex. Nach Aufarbeitung des Umsetzungsproduktes konnte nur Ornithin nachgewiesen werden. Die elektrophile Substitution wird durch die OH-Gruppe nicht begünstigt, so daß es nicht zur Reaktion kommt. Dasselbe zeigte sich bei folgender Reaktion:



Hierbei fand jedoch anstelle einer Substitution eine Umesterung statt. Die Acetylgruppe wurde vom Fluorphenol auf das Ornithin übertragen.

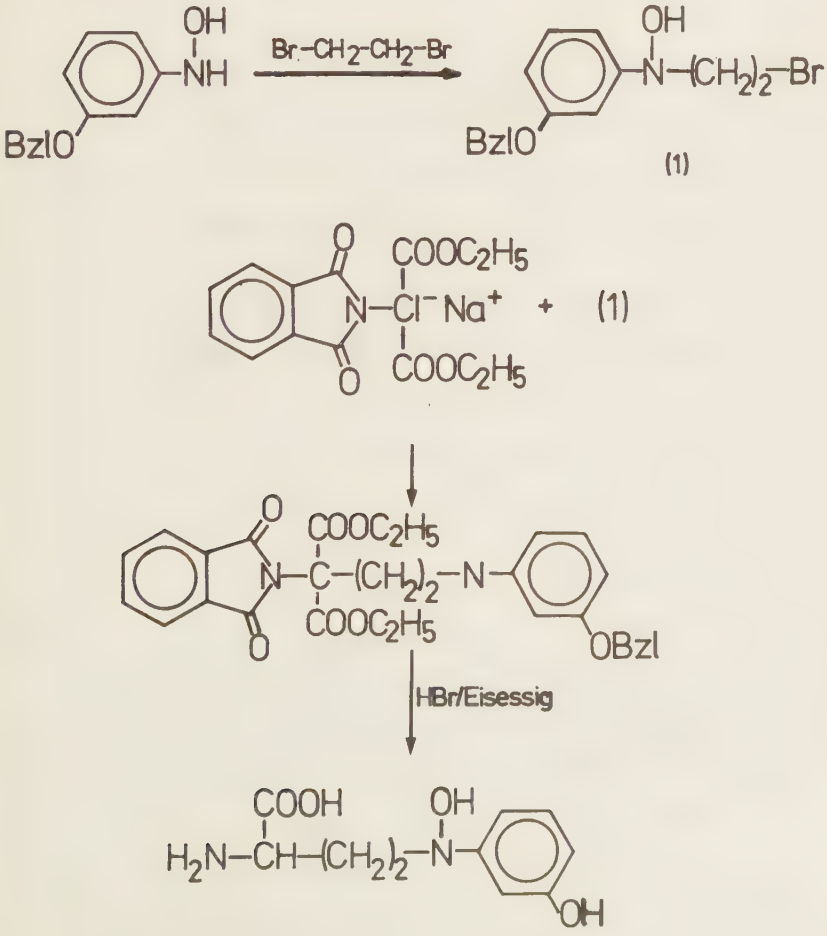
3. Synthesevorschlag



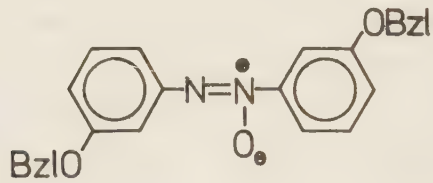


Natrium-phthalimidomalonsäureäthylester wurde mit 1,2-Dibromäthan umgesetzt zu 1-Phthalimidomalonsäureäthylester-2-brom-äthan (1)[46]. Nach Umsetzung mit O-Benzyloxyphenylhydroxylamin und nachfolgender Hydrolyse konnte im Hydrolysat nicht die Verbindung (2), sondern nur Homoserin und Bromhomoserin nachgewiesen werden.

4. Synthesevorschlag



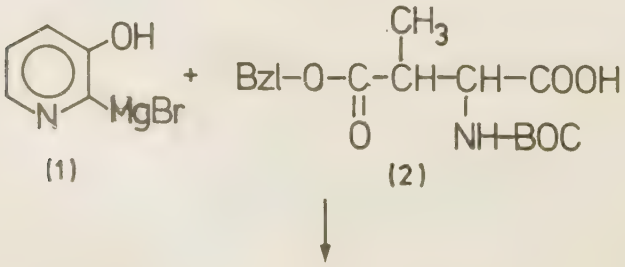
Da die Umsetzung des Hydroxylamins mit 1,2-Dibromäthan in alkalischer Lösung erfolgte, bildete sich nicht (1), sondern Azoxybenzol aus der Hydroxylamin- und der Nitrosoverbindung.

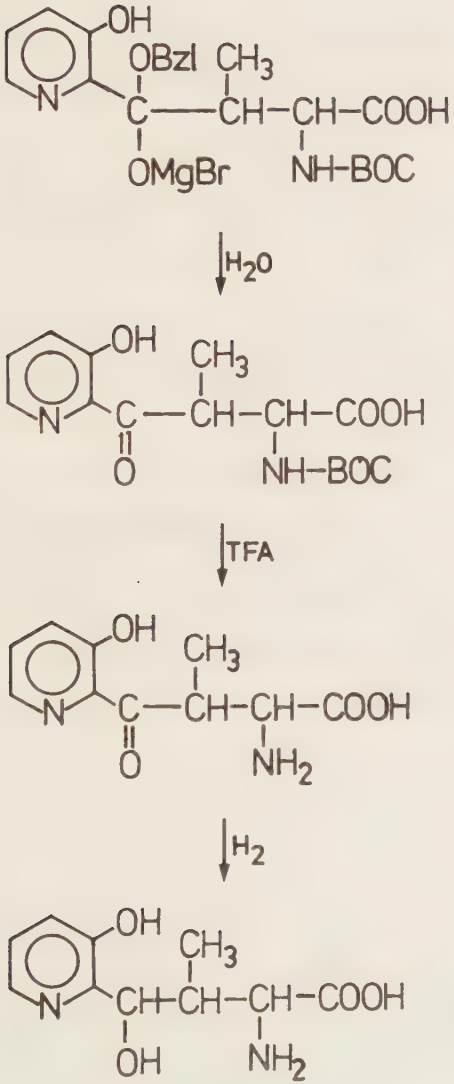


Da sich bei diesen Synthesen herausgestellt hatte, daß die N-Alkyl-N-Arylhydroxylamine nur schwer zugänglich sind (in der Literatur werden nur einige einfache Vertreter dieser Art beschrieben[47]) und sich bei der Strukturuntersuchung gezeigt hatte, daß der Aminosäure (VII/VIII) diese Struktur wahrscheinlich nicht zukommt, wurden keine weiteren Versuche zur Darstellung dieser Verbindung unternommen.

2.83 Synthese von α-Amino-ß-methyl-γ-hydroxy-γ-(5-Hydroxy)pyridyl-(2)-buttersäure

1. Synthesevorschlag




OH
OBzl
CH3
N
C
CH
CH
COOH
OMgBr
NH-BOC
H2O
OH
CH3
N
C
CH
CH
COOH
O
NH-BOC
TFA
OH
CH3
N
C
CH
CH
COOH
O
NH2
H2
OH
CH3
N
CH
CH
CH
COOH
OH
NH2

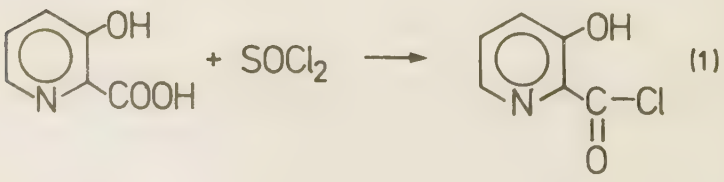
Da die Verbindung (2) (α-BOC-Amino-ß-methyl-asparaginsäure-benzylester) nicht erhältlich war, wurde bei dieser Umsetzung zunächst α-BOC-Amino-glutaminsäure-O-benzylester eingesetzt.

Nach der Abspaltung der BOC-Gruppe durch TFA wurde eine Aminosäureanalyse vorgenommen; es konnten an Hand von Vergleichssubstanzen nur Glutaminsäure und Glutaminsäurebenzylester nachgewiesen werden.

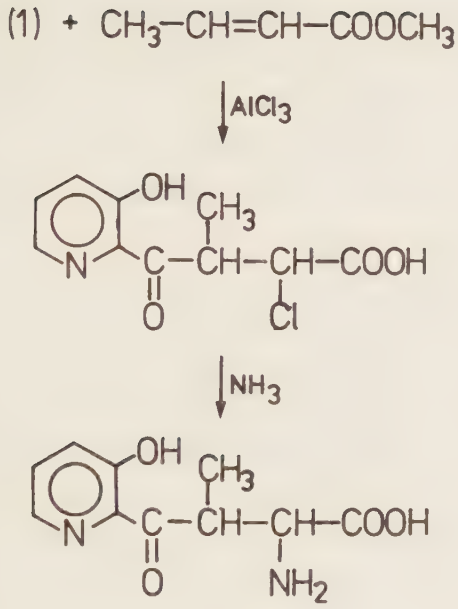
Die Grignardverbindung (1) wurde dargestellt durch Reaktion von 2-Brom-3-hydroxypyridin mit Magnesium in Tetrahydrofuran[48].

Da jedoch durch die Hydroxygruppe Nebenreaktionen auftreten können und auch in der Literatur Grignardreaktionen von Hydroxypyridinen nicht beschrieben sind, wurden als weitere Ausgangsverbindungen 2-Brompyridin und 2-Jodpyridin gewählt. Aber auch bei diesen Umsetzungen fand keine Reaktion zwischen der Grignardverbindung und dem Ester statt.

2. Synthesevorschlag [49,50]



(1)



Auch hier konnte im Reaktionsgemisch massenspektrometrisch nur das Ausgangsprodukt 3-Hydroxypicolinsäure nachgewiesen werden.

Da auch in der Literatur nur Additionen an Äthylen beschrieben sind, kann angenommen werden, daß diese Reaktion infolge sterischer Hinderung nicht möglich ist.

3. ANTIBIOTIKUM AB-31

Das Antibiotikum AB-31 wurde von H. Wolf aus dem Kulturfiltrat eines Streptomyceten-Stammes isoliert. Dieser Stamm war am Institut für Biologie in Tübingen gezüchtet worden. Da er noch nicht identifiziert ist, wird er als B-31 und das von ihm produzierte Antibiotikum als AB-31 bezeichnet.

Das von H. Wolf erhaltene Rohantibiotikum war ein braun gefärbtes Pulver.

3.1 Reinigung des Antibiotikums AB-31

Nachdem in Vorversuchen festgestellt worden war, daß die Substanz AB-31 ausgesprochen lipophile Eigenschaften hat, wurde versucht, sie durch Chromatographie an Kieselgel zu reinigen. Für die erste Trennung, durchgeführt im analytischen Maßstab, wurde das Rohprodukt in Chloroform an einer Kieselgel-Fertigsäule (Merck) chromatographiert. Es fiel auf, daß hierbei eine Substanz, und zwar wie sich später herausstellte das Antibiotikum, als rot gefärbte Bande eluiert wurde. In weiteren Versuchen im analytischen Maßstab wurden dem Chloroform wechselnde Mengen an Methanol und Ameisensäure zugesetzt, um die Zusammensetzung für das Fließmittel zu finden, bei der mit Hilfe der UV-Detektion die weitestgehende Auftrennung erzielt wurde.

Für die präparative Trennung wurde schließlich das System Chloroform / Methanol / Ameisensäure (100 + 2 + 0,25) gewählt. Das Rohantibiotikum wurde im oben genannten Elutionsmittel an einer Kieselgel-Fertigsäule chromatographiert,

wobei das in Abbildung 21 gezeigte Elutionsdiagramm erhalten wurde. Die orange gefärbten Fraktionen wurden vereinigt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels blieb als Rückstand eine rot gefärbte Substanz übrig, die aus Chloroform / Petroläther umkristallisiert wurde.

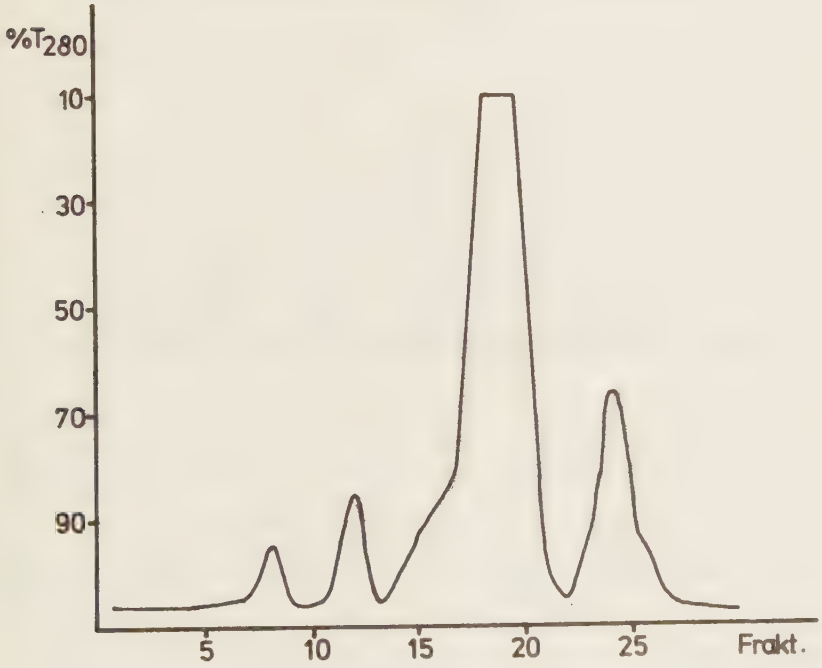


Abb. 21: Elutionsdiagramm des Antibiotikums AB-31, Chromatographie an Kieselgel

3.2 Charakterisierung des Antibiotikums AB-31

Das Antibiotikum fällt in Form von leuchtend roten Kristallen an, die einen Schmelzpunkt von 230°C besitzen. Es ist sehr gut löslich in organischen Lösungsmitteln wie Methanol,

Äthanol, Chloroform und Essigester, wenig löslich in Äther und praktisch unlöslich in Wasser.

Der Rf-Wert des Antibiotikums AB-31 im Fließmittelsystem Butanol / Eisessig / Wasser (3:1:1) ist 0,8 und im Fließmittelsystem Pyridin / Butanol / Wasser (1:1:1) 0,7.

Bei der Elementaranalyse der Verbindung wurden folgende Werte erhalten:

C	H	O	N
60,25	7,51	21,05	10,99

Die Molekulargewichtsbestimmung ergab den Wert 838,1. Danach kommt der Substanz die Summenformel zu:

$$(C_{13}H_{19}N_2O_3)_{3,5} \cong C_{46}H_{67}N_7O_{11}$$

Berechnete Werte für die elementare Zusammensetzung $C_{46}H_{67}N_7O_{11}$

C	H	O	N
62,8	7,6	20,0	11,1

Das Ultraviolett-Absorptionsspektrum (Abbildung 22) des Antibiotikums wurde in Methanol aufgenommen. Es zeigt ein Maximum bei 440 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 120), 420 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 115) und 244 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 175).

Das IR-Spektrum zeigt eine intensive Bande bei 1670 cm^{-1}, die einer Carbonylbindung in ungesättigten Ketonen, aber auch Chinonen zugeordnet werden kann. Die scharfe Bande bei 1600 cm^{-1} ist den HC = CH-Bindungen zuzuordnen. Außerdem treten Banden auf bei 1490 cm^{-1}, 1200 cm^{-1}, 1100 cm^{-1} und 950 cm^{-1}.

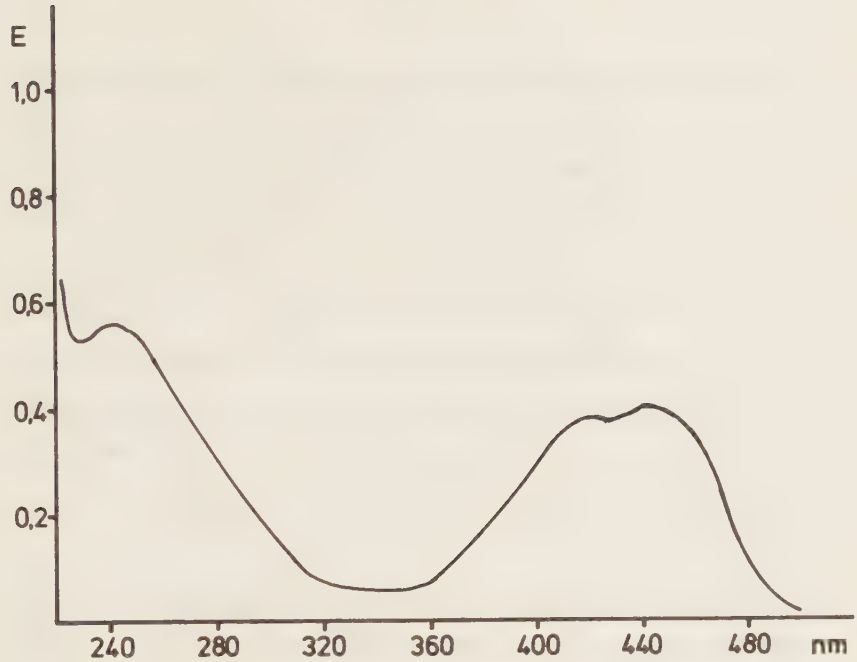


Abb. 22: UV-Spektrum des Antibiotikums AB-31 in Methanol

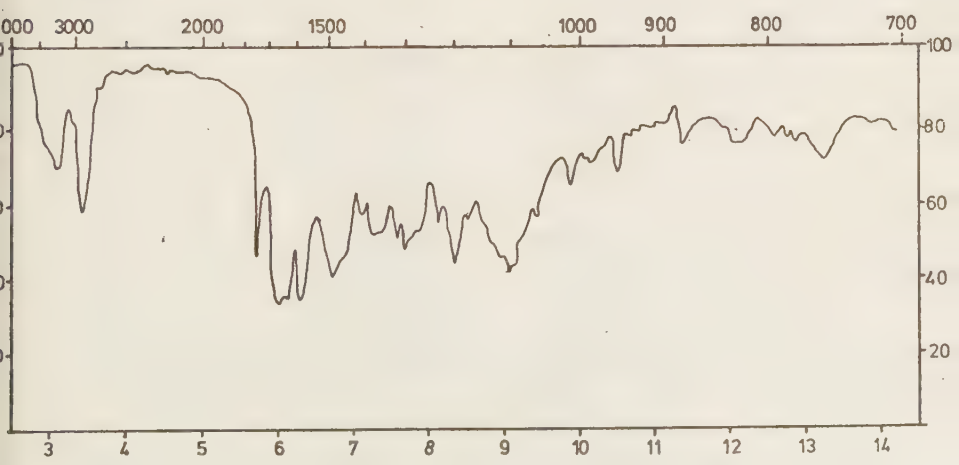
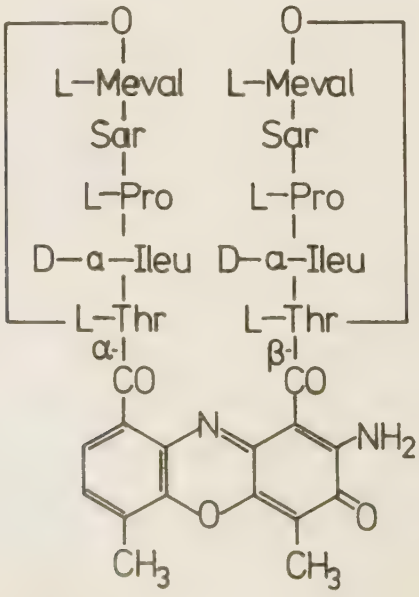


Abb. 23: IR-Spektrum des Antibiotikums AB-31 (KBr)

Die rote Farbe des Antibiotikums war Anlaß, es mit Actinomycinen zu vergleichen, einer Gruppe von roten Antibiotika, die von Streptomyceten produziert werden.

Das erste Actinomycin wurde 1940 von S. A. Waksman und H. B. Woodruff[51] isoliert. Bis 1960 waren bereits 27 Verbindungen bekannt, die dieser Substanzklasse zuzurechnen sind[52]. Bei den Actinomycinen handelt es sich um Chromopeptide, die aus einem Phenoxazon-Chromophor (Actinocin) und mehreren verschiedenen, polypeptidartig verknüpften Aminosäuren bestehen. Die verschiedenen Actinomycine unterscheiden sich nur in der Struktur der Peptidringe.

Als Beispiel sei hier die Strukturformel von Actinomycin C_3 aufgeführt, dessen Konstitution 1959 von H. Brockmann und P. Boldt[53,54] aufgeklärt wurde:



Die Actinomycine sind hochwirksam gegen grampositive Bakterien und zeichnen sich durch ihre cytostatische und tumorhemmende Wirkung aus[55]. Wegen ihrer großen Toxizität kommen sie jedoch für die Therapie bakterieller Infektionen nicht in Frage[56].

Ein Vergleich des Ultraviolett-Absorptionsspektrums des Antibiotikums AB-31 mit dem Spektrum von Actinomycin C bestätigte die Vermutung, daß AB-31 zur Gruppe der Actinomycine gehört.

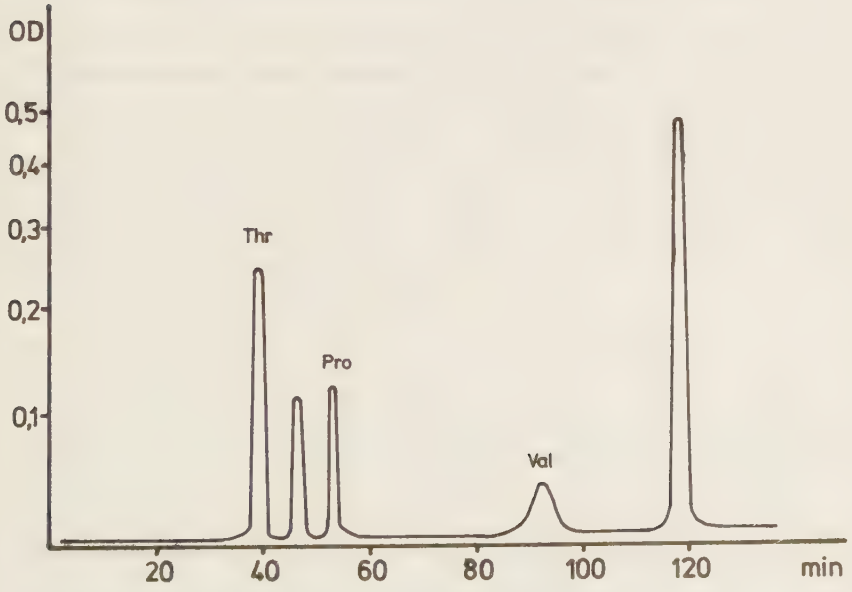


Abb. 24: Aminosäureanalyse des Antibiotikums AB-31 nach der Hydrolyse in 6 N HCl

Zum Nachweis der Aminosäuren wurde AB-31 mit 6 N HCl 15 Stunden bei 110°C hydrolysiert und das Hydrolysat an einem automatischen Aminosäureanalysator aufgetrennt. Das Chromatogramm (Abbildung 24) zeigt, daß die Substanz fünf Aminosäuren enthält. Drei Peaks konnten den Aminosäuren Threonin, Prolin und Valin zugeordnet werden. Die anderen beiden Aminosäuren wurden nicht identifiziert. Das Aminosäurechromatogramm ist jedoch völlig identisch mit dem von Actinomycin D erhaltenen.

Die rote Farbe, das UV-Spektrum, das IR-Spektrum und die Aminosäureanalyse sind ein deutlicher Beweis dafür, daß das Antibiotikum AB-31 ein Actinomycin, vermutlich reines D, ist. Daher wurde auf eine weitere Untersuchung der Substanz verzichtet.

4. ANTIBIOTIKUM AUS TÜ 1148

Das untersuchte Antibiotikum wird von einem Actinomycetalesstamm (Tü 1148) produziert. Dieser Stamm, aus einer Bodenprobe aus Zypern isoliert, wurde der Art Streptomyces noursei zugeordnet[57]. Das Antibiotikum wurde von D. Heyne aus dem Kulturfiltrat isoliert.

4.1 Reinigung

4.11 Testmethoden

Zum Nachweis der biologischen Aktivität im Plattendiffusionstest wurde als Testorganismus Streptomyces viridochromogenes (Tü 57) verwendet. Außerdem konnten die im Bioautogramm aktiven Flecken des Antibiotikums durch Besprühen mit Chlor-Tolidin-Reagenz[58] charakterisiert werden. Da das Antibiotikum nur ganz schwach Ninhydrin-positiv ist, mit Chlor-Tolidin aber eine starke Gelbfärbung zeigt, kann man annehmen, daß hier zwar ein Peptid vorliegt, dieses aber keine freie Aminogruppe hat.

4.12 Trennung an Kieselgel

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß es sich bei diesem Antibiotikum um eine Substanz handelt, die lipophile Eigenschaften besitzt. Da bei der Reinigung von AB-31 an Kieselgel sehr gute Trennergebnisse erhalten wurden, wurde die Reinisolierung auch hier an Kieselgel vorgenommen.

Als Elutionsmittel wurden Essigester / Methanol Mischungen in verschiedenen Verhältnissen ausprobiert. Am besten ge-

eignet erwies sich schließlich die Mischung Essigester / Methanol (46 + 4). Das Antibiotikum wurde auf eine Kieselgel-Fertigsäule (Merck) aufgetragen und die Trennung über ein UV-Photometer mit gekoppeltem Schreiber verfolgt (Abbildung 25). Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel abgezogen. Das so erhaltene Produkt war im Dünnschichtchromatogramm nicht ganz einheitlich, wurde aber zu den folgenden Untersuchungen verwendet.

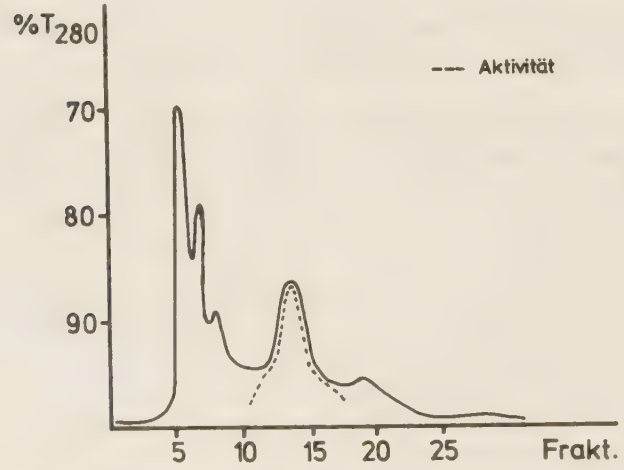


Abb. 25: Elutionsdiagramm des Antibiotikums aus Tü 1148 Chromatographie an Kieselgel

4.2 Charakterisierung

Bei der Dünnschichtchromatographie an Kieselgelplatten im Fließmittelsystem Äthanol / Eisessig / Wasser (4:1:1) hat das Antibiotikum den Rf-Wert 0,85, im Fließmittelsystem Essigester / Methanol (43 + 7) den Rf-Wert 0,56.

Nach Zusatz von Eisen(III)-chlorid-Lösung zu einer Lösung des Antibiotikums in Methanol tritt eine Gelbfärbung auf; dies könnte ein Hinweis für das Vorliegen einer Hydroxypyridinverbindung[59] sein.

Zur weiteren Charakterisierung des Antibiotikums wurde ein UV- und ein IR-Spektrum aufgenommen. Das Ultraviolett-Absorptions-Spektrum in Methanol zeigt kein Maximum, lediglich eine Schulter von 295 nm bis ungefähr 270 nm.

Im Infrarot-Spektrum (Abbildung 26) treten Banden auf bei 3200 cm^{-1}, 2900 cm^{-1}, 1730 cm^{-1}, 1650 cm^{-1}, 1620 cm^{-1} und 1530 cm^{-1}.

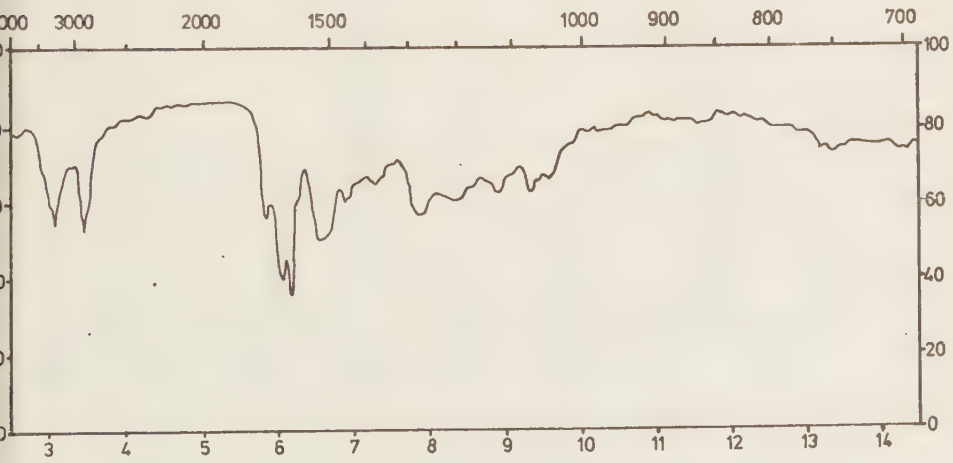


Abb. 26: IR-Spektrum des Antibiotikums aus Tü 1148 (KBr)

Die Aminosäureanalyse des Antibiotikums zeigt keinen Peak. Die Substanz wurde 15 Stunden in 6 N HCl bei 110°C hydrolysiert und das Hydrolysat an einem automatischen Aminosäure-

analysator aufgetrennt. Die in der Analyse (Abbildung 27) auftretenden Aminosäuren wurden nach ihren Elutionszeiten folgendermaßen zugeordnet: Glutaminsäure, Glycin, Valin, Leucin und Isoleucin.

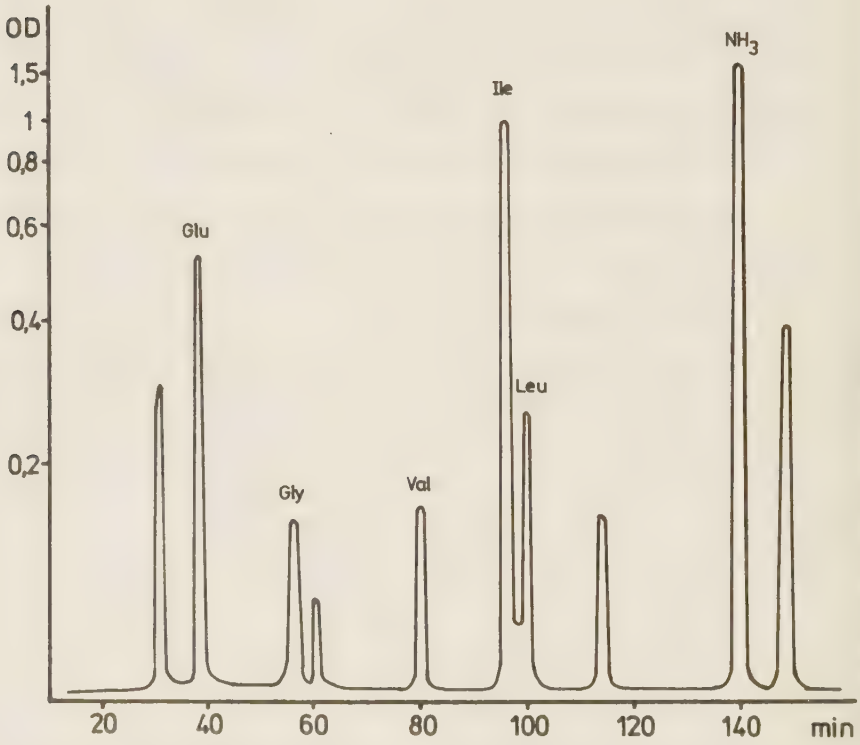


Abb. 27: Aminosäureanalyse des Antibiotikums aus Tü 1148 nach Hydrolyse in 6 N HCl

An dieser Stelle wurde die Untersuchung des Antibiotikums eingestellt, da aufgrund dieser Ergebnisse die Substanz der Gruppe der Depsipeptide zuzuordnen ist. Zu dieser Gruppe zählt eine ganze Reihe von Antibiotika wie Etamycin[60],

Streptogramin[61], Ostreogrycin[62], Vernamycin[63] und Echinomycin[64].

Von biologischer Seite aus bestand kein Interesse mehr an der Strukturaufklärung der Substanz und außerdem war die Wahrscheinlichkeit groß, daß es sich um eine beschriebene Substanz handelt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

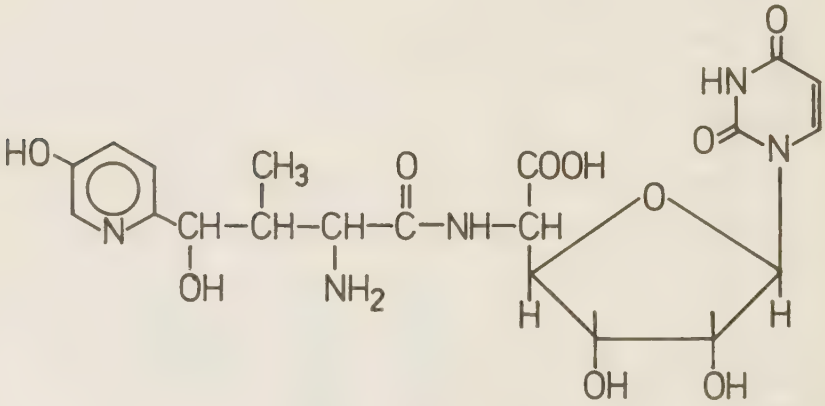
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Isolierung und Strukturermittlung von drei Antibiotika erbracht: Nikkomycin aus Tü 901 (Streptomyces tendae Ettlinger), AB-31 aus einem Streptomycetales-Stamm und Tü 1148 (Streptomyces noursei).

Für Nikkomycin, das hydrophile Eigenschaften besitzt, wurde ein Reinigungsverfahren ausgearbeitet, das sich im wesentlichen auf Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50 und Gelchromatographie an Biogel stützt. Besondere Schwierigkeit bereitete dabei die große Menge an Begleitsubstanzen und die Säurelabilität der Verbindung.

AB-31 und das Antibiotikum aus Tü 1148, beides hydrophobe Substanzen, wurden durch Chromatographie an Kieselgel-Fertigsäulen gereinigt.

Die Strukturermittlung von Nikkomycin geschah über die Strukturaufklärung von Hydrolyseprodukten. Diese Hydrolyseprodukte wurden mit Hilfe von massenspektrometrischen Un-

tersuchungen an flüchtigen Derivaten als 3-Hydroxypyridin-6-carbonsäure, C-Hydroxypyridyl-homothreonin, Uracil und Aminouronsäure identifiziert, wobei authentische Substanzen zum Vergleich zur Verfügung standen, mit Ausnahme von C-Hydroxypyridyl-homothreonin. Zur Strukturermittlung gab das NMR-Spektrum wertvolle zusätzliche Informationen. Aus den Hydrolyseprodukten ließ sich die Zugehörigkeit von Nikkomycin zu den Polyoxinen, einer Klasse von Peptidantibiotika, ableiten. Für das Antibiotikum wird folgende Struktur vorgeschlagen:



Mit Ausnahme der exakten Struktur der Aminouronsäure darf die Struktur als geklärt angesehen werden. In einigen seiner Eigenschaften, insbesondere in seiner Säurelabilität und in der Aminosäure C-Hydroxypyridyl-homothreonin, unterscheidet sich Nikkomycin von den bisher beschriebenen Polyoxinen.

Verschiedene Versuche zur Synthese der bisher nicht beschriebenen Aminosäure C-Hydroxypyridyl-homothreonin führten nicht zu der gesuchten Verbindung.

Bei der Untersuchung des Antibiotikums AB-31 wurde festgestellt, daß es zur Gruppe der Actinomycine gehört und mit großer Wahrscheinlichkeit reines Actinomycin D darstellt. Bei dem Antibiotikum aus Tü 1148 wurde die Zugehörigkeit zu der Gruppe von Depsipeptiden festgestellt, zu der auch die Antibiotika Etamycin, Streptogramin und Ostreogrycin gehören. Auf eine exakte Strukturermittlung wurde hier verzichtet.

6. EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Reinigung von Nikkomycin

6.11 Plattendiffusionstest

Das Agar-Nährmedium und die Sporensuspension zur Herstellung der Testplatten wurden von H. Höhne übernommen. Die Herstellung der Testplatten erfolgte wie bei G. Kirst[65] beschrieben.

6.12 Chemische Nachweise

Zur Identifizierung des Antibiotikums mit Hilfe chemischer Nachweisreaktionen wurden folgende Sprühreagenzien verwendet:

a) Ninhydrinlösung
   1 g Ninhydrin wurde in 100 ml Butanol gelöst und 3 ml Essigsäure zugesetzt.

b) Natriummetaperjodat - Benzidin[66]
   Sprühlösung 1: Natriummetaperjodatlösung (0,1 % in Wasser)
   Sprühlösung 2: 1,8 g Benzidin wurden in 50 ml Äthanol gelöst, mit 50 ml Wasser verdünnt, 20 ml Aceton und 10 ml 0,2 N Salzsäure zugegeben.

6.13 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden folgende Platten und Trennsysteme verwendet:

Platten: a) Cellulose-Fertigplatten Merck,
b) Kieselgel-Fertigplatten F 254 Merck.

Trennsysteme: a) Äthanol:Eisessig:Wasser = 4:1:1

b) Propanol:Wasser = 7:3

c) Butanol:Eisessig:Wasser = 3:1:1

d) Butanol:Eisessig:Pyridin:Wasser = 42:4:24:30

e) Butanol:Pyridin:Wasser = 1:1:1

f) Propanol:Pyridin:Eisessig:Wasser = 15:10:3:12

Zur Sichtbarmachung der Substanzen wurden die gleichen Sprühreagenzien verwendet, wie unter 6.12 beschrieben.

6.14 Präparative Dünnschichtchromatographie

20 mg des Antibiotikums wurden auf eine Celluloseplatte (1 mm Schichtdicke, 20 x 20 cm) strichförmig aufgetragen und im Fließmittelsystem Äthanol : Eisessig : Wasser (4:1:1) aufgetrennt.

Zur Kennzeichnung der Banden wurde die DC-Platte am Rande mit Ninhydrinlösung besprüht und an der Luft getrocknet. Die einzelnen Banden wurden ausgekratzt und die Cellulose mehrmals mit Wasser eluiert.

6.15 Analytische Trennung an Kationenaustauscherharzen

Die Kationenaustauscherharze Beckman M-72 und Aminex AG 50 WX-4 wurden jeweils in Pyridin - Essigsäurepuffer (0,1 M, pH 2,78) aufgeschlämmt und in die Säule gefüllt. Mit Hilfe eines Probenaufgebers wurde eine klare konzentrierte Lösung des Antibiotikums auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen pH-Gradienten aus je 300 ml

Pyridin-Essigsäure-Puffer 0,1 M (pH 2,78) und 1,5 M (pH 5,6) bei einer Säulentemperatur von 40°C und einer Fließgeschwindigkeit von 84 ml/h.

Das Eluat wurde in 5-ml-Fraktionen gesammelt. Die im Plattendiffusionstest aktiven und Ninhydrin-positiven Fraktionen wurden vereint, mit der äquivalenten Menge Wasser versetzt und gefriergetrocknet. Während des Trocknungsprozesses mußte das Gefriergut zwei- bis dreimal aufgetaut und erneut mit Wasser versetzt werden, da sich Nikkomycin bei zu hoher Säurekonzentration zersetzt. Nur so konnte farbloses, reines Antibiotikum erhalten werden.

6.16 Präparative Trennung an Dowex 50 WX-8

Zur Reinigung größerer Mengen Rohprodukt wurde das nach der Kohleadsorption erhaltene zähflüssige Konzentrat mit Pyridin-Essigsäure-Puffer (0,1 M, pH 2,8) verdünnt und auf eine mit Dowex 50 WX-8 gefüllte Säule (15 x 50 cm) aufgetragen. Das Harz wurde mit demselben Puffer gewaschen, bis das Eluat nur noch schwach gelb war. Zur Elution des Antibiotikums Nikkomycin diente ein Pyridin-Essigsäure-Puffer pH 5,6 (1 M).

Alle Fraktionen (je ca. 100 bis 150 ml) wurden auf Aktivität getestet, die 15 aktiven Fraktionen vereint und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis auf ca. 300 ml abgezogen. Dabei ausfallendes Pyridinacetat wurde abfiltriert, die Lösung mit ca. 600 ml Wasser versetzt und gefriergetrocknet. Ausbeute: ca. 120 g Rohantibiotikum.

6.17 Gelchromatographie

Zur Reinigung des Antibiotikums durch Gelfiltration wurden Biogel P-2 und Biogel P-6 verwendet.

Die für eine Säulenfüllung erforderliche Menge Biogel wurde in Wasser suspendiert und nach dem Quellen in eine Glassäule (4 x 150 cm) gefüllt. Das Antibiotikum wurde als konzentrierte Lösung aufgetragen.

Alle Fraktionen, die mit Ninhydrinlösung eine positive Reaktion zeigten und im Plattendiffusionstest aktiv waren, wurden vereint und gefriergetrocknet.

6.18 Verteilungschromatographie an Cellulose

Zunächst wurde eine Mischung aus 8 Teilen destilliertem Propanol und 2 Teilen destilliertem Wasser hergestellt und diese entgast. Das Cellulosepulver wurde in dem Propanol-Wasser-Gemisch aufgeschlämmt und in eine Säule (4 x 80 cm) gefüllt.

Das in wenig Wasser gelöste Nikkomycin wurde mit so viel Propanol versetzt, bis die Lösung opalisierend getrübt wurde, und auf die Cellulosesäule aufgetragen. Als Elutionsmittel fand die Propanol-Wasser-Mischung Verwendung.

Alle im Plattendiffusionstest aktiven Fraktionen wurden vereint, das Propanol am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand mit Wasser versetzt und gefriergetrocknet.

Außer Nikkomycin wurde bei dieser Auftrennung noch eine weitere Substanz, Cyclohexenylglycin, isoliert.

6.2 Reinigung des Antibiotikums AB-31 und des Antibiotikums aus Tü 1148

Beide Antibiotika wurden durch präparative Säulenchromatographie an Kieselgel-Fertigsäulen (Merck) gereinigt.

6.21 Antibiotikum AB-31

Das Rohantibiotikum wurde in wenig Elutionsmittel (Chloroform / Methanol / Ameisensäure 98 + 2 + 0,25) gelöst und mit einer Spritze auf die Fertigsäule aufgebracht. Da das Antibiotikum gefärbt war, konnte auf einen Aktivitätstest verzichtet werden. Die orange gefärbten Fraktionen wurden gesammelt, das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand aus Chloroform / Petroläther umkristallisiert.

6.22 Antibiotikum aus Tü 1148

Die Trennung an der Kieselgelsäule erfolgte wie oben beschrieben. Als Elutionsmittel diente Essigester / Methanol (46 + 4). Die einzelnen Fraktionen wurden auf Aktivität getestet, die aktiven Fraktionen vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

6.3 Hydrolysen

Für Analysen im analytischen Maßstab wurde jeweils 1 mg Substanz eingesetzt, bei präparativen Trennungen 30 mg bis 100 mg des Antibiotikums.

6.31 Totalhydrolyse

Die Substanz wurde in ein Glasrohr gebracht und in 2 ml 6 N HCl gelöst. Das Glasrohr wurde durch Abschmelzen verschlossen und 15 Stunden bei 110°C im Trockenschrank erhitzt. Danach wurde das Hydrolysat quantitativ in ein Kölbchen übergeführt und die Flüssigkeit am Rotationsverdampfer abgezogen.

6.32 Partialhydrolyse

Die Substanz wurde in einem Hydrolysenrohr mit 2 ml 12 N HCl versetzt und 48 Stunden lang bei 37°C erwärmt. Danach wurde das Hydrolysat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft.

6.33 Hydrolyse in Trifluoressigsäure

Die Substanz wurde in einem Hydrolysenrohr mit 2 ml 1 N Trifluoressigsäure versetzt und eine Stunde lang bei 100°C erwärmt. Danach wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft.

6.34 Alkalische Hydrolyse

Die Durchführung der alkalischen Hydrolyse erfolgte in Anlehnung an eine Arbeit von T. E. Hugli und S. Moore[24].

1 mg Antibiotikum wurde in einem Teflonröhrchen mit 0,6 ml 4,2 N NaOH versetzt, das Teflonröhrchen in ein Glasrohr eingeführt und dieses unter Kühlung in Aceton / Trockeneis evakuiert und abgeschmolzen. Die Probe wurde 16 Stunden bei 110°C erhitzt, danach mit 0,42 ml 6 N HCl neutralisiert

und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft.

6.4 Präparative Trennung der Säurehydrolysate

6.41 Chromatographie des Totalhydrolysats an Kationenaustauscherharz

120 mg Nikkomycin wurden in 10 ml 6 N HCl bei 110°C 24 Stunden hydrolysiert. Nach Abtrennung des entstandenen schwarzen Niederschlags und Abziehen der Salzsäure wurde der Rückstand in 1 ml Pyridin-Essigsäure-Puffer (0,1 M, pH 2,8) gelöst und an Kationenaustauscherharz Beckman M-72 mit einem Pyridin-Essigsäure-Puffer-Gradienten (300 ml 0,1 M Pyridinacetat-Puffer pH 2,8 und 300 ml 1,5 M Pyridinacetat-Puffer pH 5,6) bei einer Fließgeschwindigkeit von 84 ml/h chromatographiert.

Das Eluat wurde in 5-ml-Fraktionen gesammelt. Dabei trat im Ausschlußvolumen der Säule eine rot gefärbte Substanz auf. Von allen im Tüpfeltest Ninhydrin-positiven Fraktionen wurde eine geringe Menge am automatischen Aminosäureanalysator aufgetrennt. Fraktionen, die dabei einen Peak mit identischer Retentionszeit ergaben, wurden vereinigt und nach Zugabe einer äquivalenten Menge Wasser gefriergetrocknet. Auf diese Weise wurden neben der "roten Substanz" (IX) in reinen Substanzen Glutaminsäure (V), Glycin (VI), Uracil und C-Hydroxypyridyl-homothreonin (VII/VIII) erhalten.

Ausbeute: Rote Substanz (3-Hydroxypyridin-6-carbonsäure)

5 mg, Substanz (Glutaminsäure) 4 mg, Substanz (Glycin) 8 mg, Substanz (C-Hydroxypyridyl-homothreonin) 6 mg.

6.42 Chromatographie des Partialhydrolysats an Biogel P-6

100 mg Antibiotikum wurden in 10 ml 12 N HCl bei 37°C 48 Stunden hydrolysiert. Nach Abtrennung des schwarzen Niederschlags und Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in 5 ml Wasser aufgenommen und an Biogel P-6 zunächst mit Wasser, dann mit 1 %iger Essigsäure chromatographiert.

Die den einzelnen Peaks zukommenden Fraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

Von allen erhaltenen Proben wurde eine geringe Menge auf eine DC-Platte aufgetragen und im System Äthanol /Eisessig / Wasser (4:1:1) aufgetrennt. Nach dem Anfärben mit Ninhydrin erfolgte die Zuordnung wie folgt: Peak 6 im Elutionsdiagramm entsprach Substanz I (Nucleosid), Peak 7 entsprach Substanz VII/VIII (C-Hydroxypyridyl-homothreonin).

Ausbeute: 3 mg Substanz I, 7 mg Substanz VII/VIII.

6.5 Derivate für die Massenspektrometrie

6.51 Trimethylsilyl Derivat[67)]

100 µg Antibiotikum oder eine entsprechende Menge Hydrolysat wurden in 100 µl Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA, Firma Regis) 2 Stunden bei 100°C im Trockenschrank erhitzt. Danach wurde die Lösung massenspektrometrisch untersucht.

6.52 Perdeuterio-trimethylsilyl-Derivat[67)]

Analog zu 6.51 unter Verwendung von 100 µl Perdeuterio-bis-(trimethylsilyl)-acetamid.

6.53 Veresterung und Trimethylsilylierung[67)]

Eine Lösung von 100 µg Nikkomycin in 300 µl HCl/Methanol (1,25 N) wurde eine Stunde im Trockenschrank bei 100°C erhitzt. Danach wurde das Lösungsmittel mit Stickstoff abgeblasen und der Rückstand nach Zugabe von 100 µl BSTFA 2 Stunden bei 100°C erhitzt. Diese Lösung wurde für die massenspektrometrische Untersuchung verwendet.

6.54 Trifluoracetylierung und Methylierung mit Diazomethan[67)]

100 µg Nikkomycin wurden mit 150 µl Methylenchlorid und 50 µl Trifluoressigsäureanhydrid versetzt und bei Raumtemperatur eine Stunde stehen gelassen. Danach wurde das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand in 100 µl Methanol gelöst. Diese Lösung wurde mit frisch destillierter ätherischer Diazomethanlösung versetzt und dann sofort im Stickstoffstrom eingedampft und massenspektrometrisch untersucht.

6.55 Trifluoracetylierung und Methylierung mit HCl/Methanol

100 µg Antibiotikum oder eine entsprechende Menge Hydrolysat wurde bei Raumtemperatur mit 1,5 N HCl/Methanol eine Stunde stehen gelassen und dann das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgeblasen. Der Rückstand wurde mit 20 µl Trifluoressigsäureanhydrid, 100 µl Methylenchlorid und 5 µl

Pyridin versetzt, 4 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom eingedampft.

6.6 Synthese von 4-Dihydrokynurenin und 4-Dihydrohydroxykynurenin

6.61 Reduktion von Kynurenin

Zu einer Suspension aus 20 mg Kynurenin und 1 ml Wasser wurde eine Lösung aus 20 mg Natriumborhydrid in 1 ml Wasser gegeben. Nach 30 Minuten wurde ein Überschuß an Natriumborhydrid durch Zugabe von Essigsäure zerstört, die Lösung im Vakuum eingedampft und der Rückstand dreimal mit Methanol gewaschen. Die Verbindung wurde massenspektrometrisch als 4-Dihydrokynurenin identifiziert.

6.62 Reduktion von Hydroxykynurenin

Analog zu 6.61 wurde 1 mg Hydroxykynurenin mit 1 mg Natriumborhydrid reduziert und die entstandene Verbindung massenspektrometrisch als 4-Dihydrohydroxykynurenin identifiziert.

6.7 Synthese von N-Hydroxyphenyl-N-α-aminobuttersäurehydroxylamin

1. Synthesevorschlag

a) O-Benzylnitrophenol

Analog einer Vorschrift zur Verätherung von Phenolen nach Williamson[68] wurde aus 0,9 g Natrium und 30 ml absolutem Äthanol eine Natriumalkoholatlösung hergestellt, in die

4 g Nitrophenol, gelöst in absolutem Äthanol, eingetragen wurden. Nach Zusatz von 5 g Benzylbromid wurde 5 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Danach wurde der Alkohol weitgehend abdestilliert, der erkaltete Rückstand in 5 %ige Natronlauge gegossen und die organische Phase in Äther aufgenommen. Die Ätherphase wurde mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels erhielt man den jeweiligen Nitrophenylbenzyläther. Die Verbindungen wurden massenspektrometrisch identifiziert.

Ausbeute: 83 % o-Nitrophenylbenzyläther
73 % m-Nitrophenylbenzyläther
44 % p-Nitrophenylbenzyläther

b) N-Benzyloxyphenyl-hydroxylamin

Nach einer Vorschrift von E. Müller und W. Kreutzmann[43] zur Reduktion von substituierten aromatischen Nitroverbindungen wurden 3 g Nitrophenylbenzyläther in 40 ml 80 %igem Äthanol heiß gelöst, 0,8 g Calciumchlorid zugesetzt und unter weiterem Erhitzen innerhalb von 30 Minuten 5 g Zinkstaub eingetragen. Danach wurde der Zinkschlamm abgesaugt und vier- bis fünfmal mit heißem Äthanol gewaschen. Nach dem Abziehen des Alkohols blieb ein Wasser-Öl-Gemisch zurück, das mit Benzol versetzt und im Scheidetrichter getrennt wurde. Nach dem Trocknen des Benzols fiel beim Stehenlassen das Hydroxylamin aus.

o-Benzyloxyphenylhydroxylamin war auf diese Weise nicht darstellbar. Der o-Nitrophenylbenzyläther wurde immer

gleich zum Amin reduziert. Die m- und p-Verbindungen wurden durch massenspektrometrische Untersuchung identifiziert.

c) N,O-bis-Trifluoracetyl-DL-Homoserin
Unter Anwendung einer Vorschrift von E. Bayer et al.[44] wurden 5 g DL-Homoserin (Merck-Schuchardt, München) bei Raumtemperatur 2 Stunden in 150 ml Methylenchlorid und 50 ml Trifluoressigsäureanhydrid stehen gelassen. Nach Abziehen des Lösungsmittels fällt das Reaktionsprodukt als gelbes Öl an.

d) 2-Trifluoracetyl-amino-4-brom-buttersäure
Das in c) erhaltene Öl wurde nach W. A. Reckhow und D. S. Tarbell[69] in 100 ml absolutem Äthanol gelöst, in das zuvor 16 g Bromwasserstoffgas eingeleitet worden waren. Nach zweistündigem Erhitzen unter Rückfluß wurde nochmals Bromwasserstoffgas eingeleitet und danach eine Stunde erhitzt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Essigester aufgenommen, gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Der ölige Rückstand wurde nicht weiter gereinigt. Die Identifizierung des Produktes erfolgte durch Massenspektrometrie.

e) 300 mg N-Benzyloxyphenyl-hydroxylamin, ca. 1 g des Produktes aus d) und 1 g Natriumhydrogencarbonat wurden in 50 ml 90 %igem Äthanol 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abdestillieren des Alkohols wurde der Rückstand 3 Stunden mit 5 N NaOH bei 100°C hydrolysiert.

Anschließend wurde mit Essigsäure neutralisiert, eingedampft und das Hydrolysat an einer Kationenaustauschersäule aufgetrennt. Die Ninhydrin-positiven Fraktionen wurden gesammelt und gefriergetrocknet. Die massenspektrometrische Untersuchung der erhaltenen Substanzen ergab nur Homoserin und Homoserinlacton.

2. Synthesevorschlag

a) Ornithin-Kupfer-Komplex[45)]

5 g L-Ornithin-monohydrochlorid wurden in 50 ml Wasser gelöst, die Lösung auf 100°C erwärmt und bis zur Sättigung mit Kupfercarbonat versetzt. Die erkaltete Lösung wurde filtriert.

b) Die Lösung von a) wurde mit 2 N NaOH auf pH 10 eingestellt und langsam 2,6 g p-Bromphenol zugegeben, wobei der pH-Wert der Lösung stets auf 10 gehalten wurde. Dabei fiel ein blauer Niederschlag aus, der abgesaugt und in 6 N HCl gelöst wurde. Das Kupfer wurde mit H_2S gefällt, der Rückstand mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Wie die massenspektrometrische Untersuchung zeigte, bestand er nur aus Ornithin.

c) Die Lösung von a) wurde mit 2 N NaOH alkalisch gemacht und nach Zusatz einer äquivalenten Menge Acetylfluorphenol 30 Minuten unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Ansäuern mit 6 N HCl wurde das Kupfer durch Einleiten von H_2S gefällt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Das Dünnschichtchromatogramm des

Rückstandes zeigte zwei Ninhydrin-positive Flecken. Die massenspektrometrische Untersuchung ergab, daß der Rückstand Ornithin und Acetylornithin enthielt.

3. Synthesevorschlag

a) 1-Phthalimidomalonsäureäthylester-2-brom-äthan
Der Darstellung wurde eine Vorschrift von K. M. Ermolaev und V. I. Maimind[46] zugrunde gelegt. 20 g Natriumphthalimidomalonester, 40 ml 1,2-Dibromäthan und 15 ml Dimethylformamid wurden eine Stunde unter Rückfluß erhitzt. Zu der erkalteten Mischung wurde Chloroform gegeben, das dabei ausfallende Natriumbromid abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

b) Die Umsetzung von 1-Phthalimidomalonsäureäthylester-2-brom-äthan mit m-Benzyloxyphenyl-hydroxylamin erfolgte analog einer Vorschrift von L. W. Jones und M. C. Sneed[70]. 100 mg des Hydroxylaminderivates wurden in 10 ml 70 %igem Äthanol gelöst und mit 300 mg des Produktes von a) sowie 300 mg Natriumhydrogencarbonat 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde filtriert und die Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit 5 ml HBr / Eisessig (38 %) hydrolysiert. Im Hydrolysat konnten massenspektrometrisch lediglich Homoserin und Bromhomoserin nachgewiesen werden.

4. Synthesevorschlag

100 mg m-Benzyloxyphenyl-hydroxylamin wurden in 20 ml

70 % Äthanol gelöst und dazu 500 mg 1,2-Dibromäthan gegeben. Die Lösung wurde auf pH 11 eingestellt. Nach 15 Minuten fiel ein gelber, flockiger Niederschlag aus, der abgesaugt und durch Massenspektrometrie als Azoxybenzolderivat identifiziert wurde.

6.8 Synthese von α-Amino-ß-methyl-γ-hydroxy-γ-(5-Hydroxy)-pyridyl-(2)-buttersäure

1. Synthesevorschlag

a) Die Darstellung der Grignard-Verbindung 3-Hydroxypyridin-2-magnesiumbromid erfolgte nach der von D. E. Pearson et al.[48] beschriebenen "Mitführungsmethode". Zu 1,58 g Magnesiumspänen wurde wenig absolutes Tetrahydrofuran und einige Milliliter einer Lösung aus 5,6 g 1,2-Dibromäthan in 50 ml THF getropft. Die restliche Dibromäthanlösung wurde mit einer Lösung aus 5 g 2-Brom-3-pyridinol in 50 ml THF gemischt. Sobald die Reaktion angesprungen war, wurde diese Mischung so zugetropft, daß das THF stets siedete. Nachdem das ganze Magnesium gelöst war, wurde eine Lösung aus 10 g BOC-Glutaminsäurebenzylester in 50 ml THF zugegeben und 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen des Reaktionsgemisches wurde es durch Zugabe von 50 g gestoßenem Eis hydrolysiert und mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Das THF wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und die wäßrige Phase zweimal mit Äther extrahiert. Die wäßrige Phase und die Ätherphase wurden zur Trockne eingedampft und die BOC-

Gruppe mit Trifluoressigsäure abgespalten. Eine Aminosäureanalyse ergab, daß die Ätherphase nur Glutaminsäurebenzylester enthielt. Im Rückstand der wäßrigen Phase konnte nur Glutaminsäure und Glutaminsäurebenzylester nachgewiesen werden.

b) Analog a) wurde zur Herstellung der Grignard-Verbindung als Halogenkomponente 2-Jod-3-pyridinol eingesetzt. Aber auch hier konnten an Ninhydrin-positiven Substanzen nur Glutaminsäure und Glutaminsäurebenzylester nachgewiesen werden.

c) Auch mit 2-Brompyridin und 2-Jodpyridin wurde die Reaktion wie unter a) beschrieben durchgeführt, jedoch auch so konnte die gewünschte Verbindung nicht dargestellt werden.

2. Synthesevorschlag

a) Analog einer Vorschrift zur Darstellung von Chloriden der Pyridincarbonsäuren von E. Späth und H. Spitzner[49,50] wurde 1 g 3-Hydroxypicolinsäure mit 20 ml frisch über Leinöl destilliertem Thionylchlorid zum gelinden Sieden erhitzt, bis sich die 3-Hydroxypicolinsäure ganz gelöst hatte. Das Thionylchlorid wurde zum größten Teil abdestilliert und der Rückstand ohne weitere Reinigung mit 2 ml Crotonsäuremethylester und 2 g $AlCl_3$ versetzt. Die Mischung wurde über Nacht stehen gelassen und dann mit Eis hydrolysiert. Die organische Phase wurde in Chloroform aufgenommen, dieses mit Wasser gewaschen und

über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und der Rückstand massenspektrometrisch untersucht, wobei die Additionsverbindung jedoch nicht nachgewiesen werden konnte.

b) Auf gleiche Art wurde die Umsetzung mit Thionylbromid wiederholt. Es erfolgte jedoch auch hier keine Addition des Säurechlorids an die Doppelbindung des Crotonsäuremethylesters.

6.9 Geräte und Chemikalien

Soweit nicht bereits im Text aufgeführt, wurden folgende Geräte verwendet:

UV-Gerät:	Carry 1115
IR-Gerät:	Infracord Spectrophotometer, Perkin-Elmer
Massenspektrometer:	LKB 9000 GC/MS, LKB Produkter
Aminosäureanalysator:	Multichrom, Beckman
Fraktionssammler:	Ultrorac mit Uvicord, LKB Produkter

Continuous Freeze Dryer, New Brunswick Scientific Co. Inc.

Die Molekulargewichtsbestimmungen und Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium Dr. F. Pascher / E. Pascher, Bonn, durchgeführt.

Die eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Fluka und Aldrich bezogen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1) L. Pasteur, Oeuvres de Pasteur, Paris (1922)

2) De Bary, Die Erscheinung der Symbiose, Straßburg (1879)

3) C. Garre, Zbl. Bakteriol. Parasitenkunde, Infektionskrankheiten 2, 312 (1887)

4) E. Freudenreich, Jb. Path. Mikroorg. 5, 530 (1889)

5) M. Ward, Ann. Botany, 549 (1899)

6) R. Emmerich und O. Löw, Z. Hyg. Infektionskrankheiten 31, 1 (1899)

7) A. Fleming, Brit. J. Exp. Pathol. 10, 226 (1929)

8) R. J. Dubos, J. Exp. Med. 70/1, 11, 249 (1939)

9) S. A. Waksman und H. B. Woodruff, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 45, 609 (1940)

10) D. Perlman, Antibiotics, S. 14, Rand Mc. Nally & Company, Chicago (1970)

11) S. A. Waksman, Microbial Antagonisms and Antibiotic Substances, The Commonwealth Fund, New York (1945)

12) R. Brunner und G. Maschek, Die Antibiotica, Band 1, Verlag Hans Carl, Nürnberg (1962)

13) H. Höhne, Dissertation, Universität Tübingen (1974)

14) A. Endo, T. Misato und K. Kakiki, J. Bact. 104, 189 (1970)

15) M. Mizuno, Y. Shimojima, T. Sugavara und I. Takeda, J. Antib. A 24, 896 (1971)

16) H. Zähner, Biologie der Antibiotica, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1965)

17) D. J. McCaldin, Chem. Rev. 60, 39 (1960)

18) J. A. Cifonelli, F. Smith, Anal. Chem. 26, 1132 (1954)

19) H. Frank, Dissertation, Universität Tübingen (1973)

20) H. Kneifel, Habilitationsschrift, Universität Tübingen (unveröffentlicht)

21) F. Eisenbeiß, Chemiker Zeitung 95, 237 (1971)

22) H. Bauer, persönliche Mitteilung

23) E. Stahl und H. Kaldewey, Z. physiol. Chem. 323, 182 (1961)

24) T. E. Hugli und S. Moore, J. Biol. Chem. 247, 2828 (1972)

25) W. A. König, L. C. Smith, P. F. Crain und J. A. McCloskey, Biochem. 10, 3968 (1971)

26) W. A. König, K. Zech, R. Uhlmann und W. Voelter, Chem. Ber. 105, 262 (1972)

27) K. Isono und S. Suzuki, Tetrahedron Letters, 203 (1968)

28) K. Isono, K. Asahi und S. Suzuki, J. Am. Chem. Soc. 91, 7490 (1969)

29) K. Isono, J. Nagatsu, Y. Kawashima und S. Suzuki, Agr. Biol. Chem. 29, 848 (1965)

30) S. Suzuki, K. Isono, J. Nagatsu, Y. Kawashima, K. Yamagata, K. Sasaki und K. Hashimoto, Agr. Biol. Chem. 30, 817 (1966)

31) K. Isono, J. Nagatsu, K. Kobinata, K. Sasaki und S. Suzuki, Agr. Biol. Chem. 31, 190 (1967)

32) K. Isono, K. Kobinata, S. Suzuki, Agr. Biol. Chem. 32, 792 (1968)

33) K. Shibuya, M. Tanaka, T. Nanbata, K. Isono und S. Suzuki, Agr. Biol. Chem. 36, 1229 (1972)

34) S. Suzuki, K. Isono, M. Uramoto, H. Okamoto und M. Matsuoka, Chem. Abstr. 78, 41566t (1973)

35) K. Isono und S. Suzuki, Tetrahedron Letters 1133 (1968)

36) K. Isono und S. Suzuki, Tetrahedron Letters 203 (1968)

37) K. Isono und S. Suzuki, Agr. Biol. Chem. 32, 1193 (1968)

38) K. Isono, P. F. Crain, T. J. Odiornea, J. A. McCloskey, R. J. Suhadolnik, J. Am. chem. Soc. 95, 788 (1973)

39) K. Isono, T. Azuma und S. Suzuki, Chem. Pharm. Bull. 19, 505 (1971)

40) K. Isono, J. Nagatsu, K. Kobinata, K. Sasaki und S. Suzuki, Agr. Biol. Chem. 31, 190 (1967)

41) J. Edelson, J. D. Fissekis, C. G. Skinner und W. Shive, J. Am. chem. Soc. 80, 2698 (1958)

42) W. Keller-Schierlein, K. Poralla und H. Zähner, Arch. Mikrobiol. 67, 339 (1969)

43) E. Müller und W. Kreutzmann, A. 495, 142 (1932)

44) E. Bayer, K. H. Gugel, K. Hägele, H. Hagenmaier, S. Jessipow, W. A. König und H. Zähner, Helv. chim. Acta 55, 224 (1972)

45) R. L. M. Synge, Biochem. J. 42, 99 (1948)

46) K. M. Ermolaev und V. I. Maimind, C. A. 65, 9013 (1966)

47) G. E. Utzinger und F. A. Regenass, Helv. chim. Acta 37, 1889 (1954)

48) D. E. Pearson, D. Cowan und J. D. Beckler, J. org. Chem. 24, 504 (1959)

49) E. Späth und H. Spitzner, Ber. 59, 1477 (1926)

50) H. Meyer und R. Graf, Ber. 61, 2202 (1928)

51) S. A. Waksman und H. B. Woodruff, J. Bacteriol. 40, 581 (1940)

52) H. Brockmann, Angew. Chem. 72, 939 (1960)

53) H. Brockmann und P. Boldt, Naturwissenschaften 46, 262 (1959)

54) H. Brockmann und H. Lackner, Naturwissenschaften 47, 230 (1960)

55) H. Brockmann, Angew. Chem. 66, 1 (1954)

56) R. Brunner und G. Machek, Die Antibiotica, Band 2, S. 367, Verlag Hans Carl, Nürnberg (1965)

57) D. Heyne, Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen (unveröffentlicht)

58) G. Pataki, J. Chromatogr. 12, 541 (1963)

59) H. Vanderhaeghe und G. Parmentier, J. Am. chem. Soc. 82, 4414 (1960)

60) B. Heinemann, A. Gourevitch, J. Lein, D. L. Johnson, M. A. Kaplan, D. Vanas und I. R. Hooper, Antibiot. Ann. 728 (1954-1955)

61) J. Charney, W. P. Fisher, C. Curran, R. A. Machlowitz und A. A. Tyteli, Antibiot. Chemotherapy 3, 1283 (1953)

62) S. Ball, B. Boothroyd, K. A. Lees, A. H. Raper und E. L. Smith, Biochem. J. 68, 24 P (1958)

63) M. Bodanszky und M. A. Ondetti, Antimicrobial Agents Chemotherapy 360 (1963)

64) R. Corbaz, L. Ettlinger, E. Gäumann, W. Keller-Schierlein, F. Kradolfer, L. Neipp, V. Prelog, P. Reusser und H. Zähner, Helv. chim. Acta 40, 199 (1957)

LEBENSLAUF

Am 1. Februar 1948 wurde ich als Tochter des Elektro-Ingenieurs Theo Kiefer und dessen Ehefrau Margareta, geb. Maier, in Neuhausen a.d.F. geboren.

Nach vier Grundschuljahren in Neuhausen a.d.F. besuchte ich ab 1958 das Progymnasium Hohenheim und ab 1964 bis zum Abitur im Oktober 1966 das Mädchengymnasium St. Agnes in Stuttgart.

Die zweijährige Tätigkeit als Apothekerpraktikantin in der Pliensau-Apotheke in Esslingen am Neckar schloß ich im September 1968 mit dem Vorexamen ab.

Im Wintersemester 1968/69 begann ich an der Philipps-Universität in Marburg mit dem Pharmaziestudium, das ich am 15. April 1972 mit dem Staatsexamen beendete.

Danach arbeitete ich bis 31. Dezember 1972 in der Apotheke Neuhausen, Inhaber Frau Ruth Faber, Neuhausen a.d.F.

Unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H.-P. Hagenmaier begann ich im Januar 1973 am Chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen mit der Dissertation "Reinigung und Untersuchungen zur Strukturaufklärung von drei Antibiotika", die ich im Januar 1975 abschloß.

Im Juli 1974 heiratete ich den Dipl.-Politologen Dr. Horst Dähn.

Meine akademischen Lehrer - außer Herrn Professor Dr. H.-P. Hagenmaier - waren die Herren Professoren und Dozenten:

H. Auterhoff, H. Böhme, K. Hartke, S. Ebel, G. Seitz, B. Unterhalt (Pharmazie); H. Nöth, K. Dimroth, E. Bayer (Chemie); W. Nultsch (Botanik); H. Kating (Pharmakognosie); P. H. List (Pharmazeutische Technologie); W. Walcher (Physik); W. Schiff (Hygiene); R. Schmitz (Geschichte der Pharmazie).

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
7000 Stuttgart 1, Forststrasse 58
Telefon (0711) 61 06 41 / 42

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
7000 Stuttgart 1, Forststrasse 58
Telefon (0711) 61 06 41 / 42